



Departamento de química

Desenvolvimento de estratégias para aumentar a produtividade e controlar as propriedades de biopolímeros (PHAs) produzidas por culturas mistas

Por:

Lyuko Leite Abe

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica.

Orientador: Professora Doutora Maria Ascensão Miranda Reis

Co-orientador: Doutora Maria da Graça Ejarque Albuquerque

Lisboa

2010

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram na realização desta tese de dissertação.

Entre elas:

A minha orientadora Professora Doutora Maria Ascensão Reis pela enorme sabedoria, por todo o apoio e orientação prestada nestes meses de trabalho.

A minha co-orientadora Maria da Graça Ejarque Albuquerque pela amizade sempre demonstrada, pela atenção dispensada e todo o apoio.

Ao professor Svetlozar Georgiev Velizarov pelos conselhos, por todo o apoio e atenção dispensada neste trabalho.

A Ana Rita Ricardo pela amizade e ajuda neste trabalho.

À D. Joaquina Lopes, D. Palminha e à D. Maria José pela simpatia e atenção sempre dispensada.

Aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os meus amigos em especial ao Ivan, que sempre esteve do meu lado.

A todos,

MUITO OBRIGADO!

Lista de abreviaturas

ADF or (FF)	Aerobic Dynamic Feeding or (Feast and Famine)	Alimentação dinâmica aeróbia (Fome e Fartura)
AEM	Anion Exchange Membrane	Membrana de troca aniônica
VFA	Volatile fatty acid	Ácido carboxílico volátil
PHA	Polyhydroxyalkanoate	Polihidroxialcanoato
VSS	Volatile Suspended Solid	Sólidos suspensos voláteis
IEMB	Ion exchange membrane bioreactor	Bioreactor de membrana de troca iônica
FM	Fermented molasses	Melaço Fermentado
Hac	Acetic acid	Ácido acético
HB	Hydroxybutyrate	Hidroxibutirato
HBut	Butiric acid	Ácido butírico
HProp	Propionic acid	Ácido propiónico
HV	Hydroxyvalerate	Hidroxivalerato
HVal	valeric acid	Ácido valérico
SBR	Sequencing Batch Reactor	Reactor descontínuo sequencial
CSTR	Continuous Acidogenic Fermentation Reactor	Reactor de fermentação contínuo
MMC	Mixed microbial cultures	Cultura microbiana mista
HRT	Hydraulic Retention Time	Tempo de retenção hidráulico

Resumo

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis, constituindo uma alternativa promissora aos plásticos convencionais. No entanto, são produzidos por fermentação de culturas microbianas puras usando substratos de custo elevado. Nos últimos anos, têm vindo à desenvolver-se estratégias alternativas com vista a redução dos custos de produção, nomeadamente o uso de culturas microbianas mistas e substratos de baixo custo. Apesar do potencial demonstrado por estas culturas mistas, existem ainda algumas limitações. Esta tese tem como objectivo o aperfeiçoamento do processo de produção de PHAs por culturas mistas.

A produção de PHAs por culturas mistas baseia-se no enriquecimento das culturas em organismos acumuladores de PHAs em condições de “Fome e Fartura” (FF). A cultura seleccionada é então utilizada para produção de PHAs. Foi estudado um processo em 3 etapas: (1) fermentação do melaço (conversão de açúcares em ácidos orgânicos voláteis – VFAs); (2) selecção da cultura em condições FF usando fermentado de melaço como fonte de carbono; (3) produção de PHAs usando a cultura seleccionada em (2) e o fermentado de melaço produzido em (1).

Este estudo focou em particular a terceira etapa do processo com vista a aumentar a sua produtividade volumétrica e demonstrar a possibilidade de manipular a composição dos polímeros produzidos. Foram estudados os efeitos do regime de alimentação (contínuo e por pulsos) e do perfil de VFAs na composição do polímero. A alimentação em contínuo permitiu elevar a produtividade volumétrica até 1.2 gPHA /L.h, e ao mesmo tempo aumentar o conteúdo em hidroxivalerato em 11%. Os diferentes ensaios levaram à produção de co-polímeros de hidroxibutirato e hidroxivalerato (P(HB-co-HV)) com conteúdo de HV numa gama de 15 a 39%.

Paralelamente, de modo a aumentar a produtividade volumétrica, estudou-se ainda o transporte de VFAs através de membranas de permuta aniónica com vista a desenvolver um processo integrando o transporte de VFAs através da membrana e a produção de PHAs. Esta integração permitiria minimizar o volume do reactor de produção, resultando num aumento significativo da produtividade. Foi ainda estudada a possibilidade de usar este tipo de transporte como forma de fazer uma alimentação controlada, com vista a manipular a composição do polímero resultante. Testaram-se duas membranas diferentes, o efeito da concentração de contra-ião e da presença de possíveis iões competidores. Apesar de não ter sido possível otimizar as condições de transporte, foi possível aferir a possibilidade de se usar uma membrana de troca iónica como forma de seleccionar os ácidos a transportar preferencialmente.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable polymers produced from renewable sources, providing a promising alternative to the conventional plastic. However, they are produced by pure microbial culture fermentation technology with high costs substrate. In the last decade, research has focused on the development of alternative production processes aiming at decreasing these production costs, namely mixed microbial cultures and low cost carbon sources.

Although the potential demonstrated for these mixing cultures, there are some limitations. This thesis aims at improving the production process of PHA by mixed cultures.

The PHAs production by mixed cultures based on enrichment cultures in PHA accumulating organisms in “ Feast and Famine (FF) ” conditions. The selected culture is then used to PHA production.

A three-stage PHA production process was developed, including: (1) molasses anaerobic fermentation (sugars are converted into volatile fatty acids – (VFAs)); (2) Culture selection in FF conditions using the fermented molasses feedstock as carbon source (3) PHA production using the selected cultures in (2) and the clarified fermented molasses in (1).

This particular study focused on the third step of the process in order to increase the volumetric productivity and show the possibility of manipulating polymer composition produced.

The effect of the feeding regime (continuous versus pulse wise feeding) and VFAs profile on polymer composition was evaluated. The use of continuous feeding resulted in increased volumetric productivity until 1.2 gPHA /L.h, and at the same time increased the HV contents by up to 11%. The different assays resulted in copolymers production of hydroxyvalerate and hydroxyvalerate (P(HB-co-HV)) with HV fraction ranging from 15 to 39%.

At the same time, in order to increased the volumetric productivity, it was also studied the VFAs transport by a novel anion exchange membrane-assisted in order to develop a process integrating the VFAs transport through the membrane and the PHAs production. This integration would minimize the volume of the reactor production, resulting in a significant increase of the productivity. It was also studied the possibility of using the transport, in order to manipulate the resulting polymer composition. It was tested two different membranes, the effect of counter-ion concentration and the presence of possible competitors ions. Although it wasn't possible to optimize the transport conditions, it was possible to access the possibility of using an ion exchange membrane in order to select the preferentially acid to transport.

Índice

1. Motivação.....	13
2. Estado de arte / Revisão bibliográfica	15
2.1. Polihidroxicarboxilatos (PHAs): estrutura e propriedades	15
2.2. Produção de PHAs por culturas puras	16
2.3. Produção de polihidroxicarboxilatos (PHAs) por culturas mistas	17
2.3.1. Mecanismo de selecção de culturas mistas produtoras de PHAs: Fome e Fartura	19
2.3.2. Produção de PHAs	21
2.4. Membranas de permuta aniónica e seu uso em downstream de fermentações	23
3. Objectivo da tese	26
4. Materiais e métodos	27
4.1. Produção de PHAs por uma cultura mista a partir do melaço da cana27	
4.1.1. Meios	27
4.1.2. Sistema experimental	28
4.1.3. Produção de PHAs	29
4.2. Métodos analíticos	31
4.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de PHAs.....	32
4.4. Transporte dos ácidos na membrana de troca iónica.....	33
4.5. Métodos analíticos para monitorizar estudo de transporte de VFAs ...	35
4.6. Cálculos de fluxo, permeabilidade e outros parâmetros associados ao transporte de VFAs através de membranas	36
5. Resultados	37

5.1	Estratégias para optimização da produção de PHAs por uma cultura mista enriquecida usando melaço fermentado como fonte de carbono	37
5.1.1.	Efeito do perfil de VFAs na produção de PHAs (rendimento e composição do polímero)	37
5.1.2.	Efeito do regime de alimentação na produtividade	41
5.1.3.	Efeito do regime de alimentação na composição do polímero	50
5.2.	Estudo do transporte de ácidos carboxílicos de cadeia curta (VFA) por uma membrana de troca iónica	51
5.2.1.	Seleccção da membrana	51
5.2.2.	Efeito de Fouling no transporte de VFAs	56
5.2.3.	Determinação da permeabilidade da membrana seleccionada para os diferentes ácidos	60
5.2.4.	Efeito da concentração de NaCl no transporte de VFAs	66
5.2.5.	Efeito dos iões competidores do melaço fermentado	70
5.3.	Composição do polímero	76
6.	Conclusão	77
7.	Bibliografia	80

Índice de Figuras

<i>Figura 2.1-1: Estrutura química do PHA em que n indica o número de átomos de carbono na estrutura linear do polímero e R1 e R2 indicam as cadeias variáveis de hidrocarbonetos-----</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2.3-1: Esquema da instalação experimental do processo de produção de PHAs em 3 etapas usando uma cultura mista seleccionada em reactor SBR e usando melaço fermentado como fonte de carbono. -----</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2.3-2: ADF ou (fome e fartura) -----</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2.4-1: Mecanismo de transporte de aniões com uma membrana de troca aniônica-----</i>	<i>25</i>
<i>Figura 5.1-1: Ensaio de acumulação em Batch com misturas de VFA: (a) Alimentação por pulsos A1, (b) Alimentação por pulsos A2 e (c) Alimentação em contínuo A3 -----</i>	<i>45</i>
<i>Figura 5.1-2: Produtividade volumétrica de PHA (em g PHA/L h) taxa instantânea de armazenamento de PHA (em g PHA/L.h) e teor em PHA (%) ao longo do tempo para ensaio por pulsos A1 (a) e A2 (b) – respectivamente sem controle de pH – e ensaio de alimentação em contínuo A3 (c); (d) Produtividade de PHA (em g PHA/L h) em função do teor em PHA (%) para ensaios A1, A2 e A3. -----</i>	<i>49</i>
<i>Figura 5.2-1: Efeito da membrana no transporte de VFAs (membrana fumasep [(a) e (b)] vs membrana 100Da [(c) e (d)]) -----</i>	<i>52</i>
<i>Figura 5.2-2: Comparação entre o perfil dos ácidos quando usado a membrana Fumasep FTAM e a membrana 100Da -----</i>	<i>53</i>
<i>Figura 5.2-3: Diferença entre concentração de Feed e Strip - (Membrana Fumasep FTAM vs Membrana 100Da) -----</i>	<i>55</i>
<i>Figura 5.2-4: Efeito de fouling na membrana (Membrana Fumasep FTAM limpa [(a) e (b)] vs membrana Fumasep FTAM usada [(c) e (d)]) -----</i>	<i>57</i>
<i>Figura 5.2-5: Diferença entre concentração de “Feed” e “Strip” (Membrana Fumasep FTAM vs Membrana Fumasep FTAM usada pela segunda vez) -----</i>	<i>59</i>
<i>Figura 5.2-6: Ensaio com mistura sintética de VFAs -----</i>	<i>61</i>
<i>Figura 5.2-7: Ensaio da mistura sintética de VFAs para cada ácido-----</i>	<i>62</i>
<i>Figura 5.2-8: Permeabilidade dos diferentes ácidos por diálise de Donnan e difusão simples -</i>	<i>65</i>
<i>Figura 5.2-9: Efeito da concentração de NaCl 0,5M [(a) e (b)]vs NaCl 0,1M [(c) e (d)] (Membrana Fumasep FTAM) -----</i>	<i>67</i>
<i>Figura 5.2-10: Diferença entre concentração do Feed e Strip (Efeito da concentração de NaCl 0,1M vs 0,5M)-----</i>	<i>69</i>
<i>Figura 5.2-11: Efeito dos iões competidores presentes no melaço fermentado no transporte de VFAs -----</i>	<i>71</i>
<i>Figura 5.2-12: Efeito dos iões competidores-----</i>	<i>74</i>
<i>Figura 5.3-1: Composição do polímero -----</i>	<i>76</i>

Índice de Tabela

<i>Tabela 4.4-1: Resumo dos ensaios de transporte de ácidos carboxílicos numa membrana de permuta iónica, usando fermentado de melaço ou simulado (com diferentes composições de VFAs, contra-íão e membranas).</i>	34
<i>Tabela 5.1-1: Resumo dos testes realizados em batch alimentando a cultura enriquecida do reactor SBR (seleccionados usando melaço fermentado como matéria-prima) com ambas usando melaço fermentado real ou simulado (com diferentes composições de VFAs: A, B e C) usando alimentação por pulsos ou alimentação contínua.</i>	39
<i>Tabela 5.1-2: Parâmetros estequiométricos e cinéticos de armazenamento de PHA em função do regime alimentar e controle de pH</i>	43
<i>Tabela 5.2-1: Ensaios de transporte de melaço fermentado contra solução cloreto 0,5 M através de membranas 100Da e Fumasep FTAM</i>	54
<i>Tabela 5.2-2: Efeito de fouling na membrana no transporte de VFAs</i>	58
<i>Tabela 5.2-3: Declive de concentrações dos ácidos carboxílicos do ensaio 3</i>	59
<i>Tabela 5.2-4: Determinação da permeabilidade para os diferentes ácidos (Remover o efeito da concentração de ácido a transportar</i>	63
<i>Tabela 5.2-5: Valores de permeabilidade para cada ácido</i>	64
<i>Tabela 5.2-6: Efeito da concentração de NaCl (0,5M vs 0,1M)</i>	68
<i>Tabela 5.2-7: Concentração de aniões inorgânicos no melaço fermentado (mmol/L)</i>	70
<i>Tabela 5.2-8: Resumo dos ensaios para testar o efeito dos iões competidores no transporte de VFAs</i>	72

1. Motivação

A produção e o consumo de plásticos de síntese química têm vindo a crescer ao longo das últimas décadas originando grandes problemas de contaminação ambiental por estes não serem biodegradáveis. No entanto este crescimento poderá vir a estagnar, devido à diminuição das reservas de petróleo e consequente aumento do preço desta matéria-prima. Esperar-se-ia, por isso, uma diminuição do mercado dos plásticos a partir de 2020, a não ser que novos materiais poliméricos sejam desenvolvidos a partir de fontes de carbono renováveis (Cranc e Patel, 2005).

A utilização de plásticos sintéticos geram cerca de 25 Mton/ano de resíduos em Europa e nos Estados Unidos. Somente 20 % de resíduos são reciclados ou incinerados sendo a restante fração descartada em aterros ou em ambientes marinhos. A substituição de plásticos de síntese química por plásticos biodegradáveis pode reduzir cerca de 20 % o volume total de resíduos descartados e em 10% o respectivo peso (EPA, 2000).

Existem vários tipos de bioplásticos, actualmente em desenvolvimento. Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por microorganismos a partir de fontes de carbono naturais (açúcares, ácidos orgânicos) renováveis. Os PHAs apresentam propriedades térmicas e mecânicas próximas das de termoplásticos de origem petroquímica sendo, no entanto, ao contrário destes últimos, completamente biodegradáveis. Dependendo do tipo e da proporção relativa dos monómeros Hidroxi Ácidos (HA), os biopolímeros apresentam uma ampla gama de propriedades estruturais, térmicas e mecânicas. Embora estes biopolímeros já sejam produzidos industrialmente, a sua comercialização ainda é limitada a aplicações de alto valor devido ao seu elevado custo de produção.

Até a data, os PHAs são produzidos industrialmente por fermentação com culturas microbianas puras, usando meios bem definidos e substratos de elevado custo (eg. Açúcares refinados). Em alternativa, a utilização de culturas microbianas mistas (que não necessitam de esterilidade), associada ao uso de substratos de baixo custo, poderá reduzir os seus custos de produção, aumentando assim o seu potencial de mercado. O potencial de culturas

microbianas mistas (MMC) para a produção de PHAs foi extensivamente investigado nos últimos 10 anos (revisto por Dias *et al.*, 2006 e Serafim *et al.* 2008), a fim de desenvolver processos de produção de PHAs de baixo custo.

Culturas mistas são consórcios microbianos, ou seja, populações microbianas compostas por vários tipos de microrganismos, cuja composição nem sempre é conhecida. Nestes sistemas biológicos, a composição das culturas é determinada pelas condições operacionais impostas sobre o sistema. A selecção de culturas mistas para produção de PHAs baseia-se na selecção de microrganismos com elevada capacidade de armazenamento intracelular de polímero devido à imposição de condições operacionais que limitam o metabolismo primário.

Este tipo de culturas tem demonstrado um bom potencial para a produção de PHAs atingindo produtividades específicas (quantidade de polímero produzido por grama de célula por unidade de tempo) elevadas, rendimentos (quantidade de polímero por quantidade de substrato consumido) elevados e conteúdos intracelulares máximos de PHAs quase semelhantes, aos obtidos com culturas puras.

No entanto, estes sistemas ainda apresentam desempenhos muito inferiores aos obtidos por fermentação com culturas puras em termos de produtividade volumétrica. Isto deve-se ao facto da concentração celular nos processos com culturas mistas, de um modo geral, consideravelmente mais baixa que as obtidas com culturas puras. Isso resulta das condições transientes de disponibilidade de fonte de carbono em que o reactor de selecção é operado e que condicionam o metabolismo primário da cultura. O desenvolvimento de estratégias para melhorar a produtividade volumétrica dos processos de produção de PHAs por MMC é essencial para alcançar produtividades semelhantes a processos de culturas puras (mas com menores custos), de forma a reduzir assim os custos de produção de PHA.

2. Estado de arte / Revisão bibliográfica

2.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs): estrutura e propriedades

Os PHAs são termoplásticos que possuem propriedades físicas e químicas muito semelhantes às do polipropileno, o que os torna possíveis candidatos progressivamente mais aplicáveis na sua substituição (Figura 2.1-1).

As propriedades térmicas e mecânicas dos polihidroxialcanoatos (PHAs) dependem directamente da sua composição, estrutura e distribuição do peso molecular. Os PHAs, estão classificados segundo o seu peso molecular variando entre 10,000 a 3×10^6 (Lee, 1996; Cranc e Pattel, 2005). Apresentam uma estrutura semicristalina, com um grau de cristalinidade variando entre 40 a 80% (Abe e Doi, 1999). Variando o comprimento da cadeia do monómero do PHA afecta a hidrofobicidade e uma série de outras propriedades, como a temperatura de fusão e de transição vítrea e o nível de cristalinidade.

A incorporação de diferentes tipos de monómeros reduz a cristalinidade do polímero por perturbar a rede cristalina. O polihidroxibutirato (PHB), constituído por monómeros de 3-hidroxibutirato, é o PHA mais bem caracterizado e o acumulado com maior frequência por bactérias (Madigan *et al.*, 2000).

Este biopolímero apresenta uma temperatura próxima a 180°C (Kunioka e Doi, 1990) e uma temperatura de transição vítrea por volta de 4°C (Mitomo *et al.*, 1999). No entanto, P(3HB) é um polímero altamente cristalino (55 - 80%) resultando em materiais bastante duros e quebradiços enquanto que o co-polímero P(HB-co-HV) apresenta menor cristalinidade devido à incorporação na estrutura de monómeros de HV. A temperatura de fusão e temperatura de transição vítrea deste co-polímero (em comparação com P(3HB)) diminui de 0 a 30% fracção molar de HV (Bluhm *et al.*, 1986; Feng *et al.*, 2002).

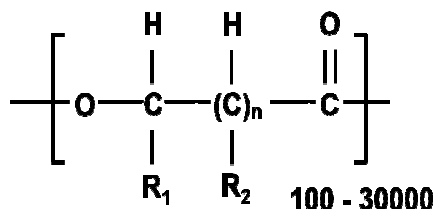


Figura 2.1-1: Estrutura química do PHA em que n indica o número de átomos de carbono na estrutura linear do polímero e R1 e R2 indicam as cadeias variáveis de hidrocarbonetos

A degradação biológica dos PHAs depende de muitos factores relacionados tanto com as condições ambientais (temperatura, nível de humidade e pH) como com as condições do polímero (cristalinidade, composição e área superficial). Os PHAs são totalmente biodegradáveis tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias e com uma taxa mais lenta em ambientes marinhos (Biomer, PHB Industrial, Telles, 2009).

A variação das posições do radical R e do grupo hidroxilo (n) nas unidades monoméricas, assim como o grau de polimerização, influencia as propriedades físicas do polímero (LEE, 1996).

2.2. Produção de PHAs por culturas puras

Até a data todos os processos industriais de produção de PHAs usam a tecnologia de fermentação de culturas puras. No entanto nos últimos anos tem sido dedicado um esforço considerável para desenvolver estratégias de fermentação de culturas puras para um processo de PHA economicamente mais viável. O preço dos PHAs é cerca de nove vezes superior ao do polipropileno (€ 9/kg para o PHB contra €1/kg para o polipropileno) (Biby, 2002).

A razão principal do elevado custo dos PHAs é o facto de actualmente serem produzidos por culturas microbianas puras e substratos caros (glucose e ácido propiónico), o que resulta em custos elevados de investimento e de

produção (necessidade de maior controlo de operação e de equipamento auxiliar para esterilização). As estratégias aplicadas para atingir esses objectivos incluem o uso de certos tipos de organismos (eg. *C. necator* e *A. latus*) alimentados com diferentes substratos puros sob limitação de nutrientes. A produção de PHA por *E. coli* sinteticamente modificada atingiu com um teor de PHA na gama de 80-90% de peso seco da célula (Lee e Choi, 1998; Lee *et al.*, 1999; Madison e Huissman, 1999; Grothe *et al.*, 1999). Apesar da elevada produtividade volumétrica obtida (até 5 g PHB/L.h) os custos de produção ainda são demasiado altos para se tornar uma opção economicamente viável para a produção de polímeros.

2.3. Produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) por culturas mistas

Os processos de produção de PHA envolvendo culturas mistas devem ser operadas em 2 ou 3 etapas, dependendo do tipo de substrato usado como matéria-prima (Dias *et al.*, 2006 e Serafim *et al.*, 2008) (Figura 2.3-1). Se se usar um meio quimicamente definido, o processo tem 2 etapas:

- 1) Selecção de cultura em condições de Fome e Fartura;
- 2) Produção de PHAs até ao conteúdo máximo em polímero usando a cultura previamente seleccionada.

Se se pretender usar um substrato de baixo custo a partir de um sub-produto ou resíduo o processo tem 3 etapas:

- 1) Fermentação do efluente usado como fonte de carbono (porque as culturas mistas não são capazes de usar açúcares para produzir PHAs): durante a fermentação os açúcares são convertidos em VFAs. Esta fermentação é feita em contínuo e em condições anaeróbias;
- 2) Selecção da cultura em condições de Fome e Fartura;

3) Produção de PHAs com cultura seleccionada em 2 e fermentado produzido em 1.

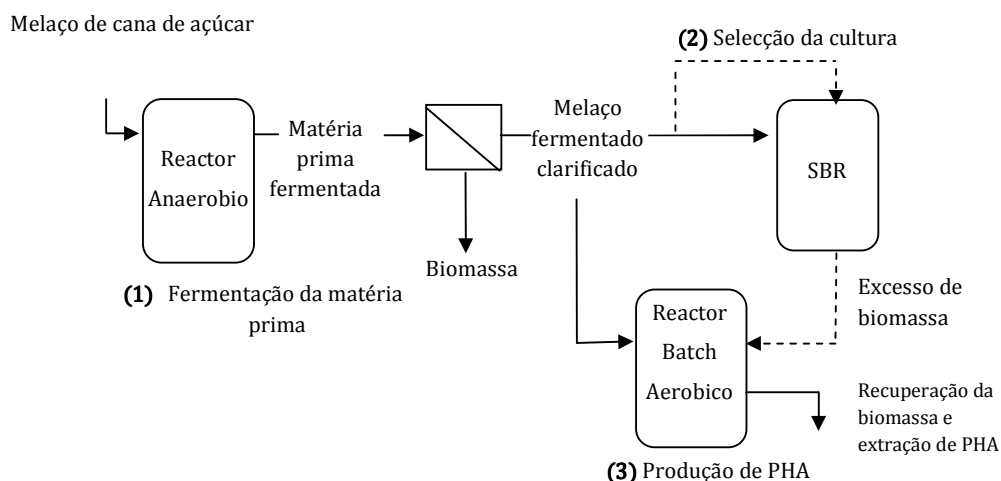


Figura 2.3-1: Esquema da instalação experimental do processo de produção de PHAs em 3 etapas usando uma cultura mista seleccionada em reactor SBR e usando melaço fermentado como fonte de carbono.

A abordagem de duas etapas tem sido aplicada principalmente quando há substratos quimicamente definidos (como por exemplo: VFAs simples como acetato, propionato, butirato e valerato, ou misturas de VFAs) usadas como fonte de carbono para produção de PHAs (Beccari *et al.*, 1998; Beun *et al.*, 2000, 2002; Dionisi *et al.*, 2001, 2004; 2006a; Serafim *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009).

Albuquerque *et al.* (2007) desenvolveu um processo de produção em três etapas a partir de melaço de cana. Apesar de seleccionada uma cultura estável, o desempenho da acumulação de PHA era inferior ao que tinha sido referido em culturas mistas utilizando matérias-primas quimicamente definidas (Dias *et al.*, 2006; Serafim *et al.*, 2008).

Além disso, a maioria das publicações descrevem o uso de outros efluentes industriais usados para produção de PHAs em 3 etapas: Dionisi *et al.* (2005) propôs um processo de produção de PHAs a partir de efluentes de fábricas de azeite (EFA), no qual uma cultura de acumulação de PHA é seleccionada em uma mistura de ácidos orgânicos sintéticos, seguido por produção de PHA em modo descontínuo com EFA fermentadas e da cultura

seleccionada. Este processo foi recentemente alterado para realizar tanto a cultura de selecção e de acumulação de PHA usando o EFA fermentado como matéria-prima (Beccari *et al.*, 2009). Bengtsson *et al.* (2008) desenvolveu um processo de três etapas para a produção de PHA a partir de efluentes de pasta de papel, incluindo a fermentação contínua de efluentes da pasta de papel ou pela selecção de uma população microbiana usando o fermentado e finalmente um terceiro passo em que se usa a cultura seleccionada e o fermentado. Neste ponto, não é claro qual das estratégias para a selecção de cultura permite o maior processo de PHA rendimento e produtividade.

2.3.1. Mecanismo de selecção de culturas mistas produtoras de PHAs: Fome e Fartura

Quando uma cultura microbiana experimenta um aumento brusco na concentração de substrato disponível, após um período de limitação do crescimento, podem ocorrer dois tipos de adaptação, que dependem essencialmente da natureza do substrato, da cultura microbiana e das condições de operação (Daigger e Grady, 1982): a biomassa pode adaptar-se às novas condições aumentando o crescimento celular (crescimento como resposta) ou acumular rapidamente o substrato sob a forma de reservas intracelulares (acumulação como resposta). A acumulação de reservas é a resposta mais rápida porque requer uma menor adaptação fisiológica dos microrganismos. Nestas condições, há um desacoplamento entre o consumo de substrato e o crescimento, ocorrendo acumulação de reservas intracelulares.

Em culturas seleccionadas em condições transientes de disponibilidade de fonte de carbono, designadas por fartura e fome (FF), o fenómeno de acumulação de reservas intracelulares é geralmente dominante (cerca de 70% da fonte de carbono externa é acumulada como biopolímero intracelular) sobre o crescimento. Se o tempo de exposição ao substrato se prolongar de tal modo que ocorra adaptação fisiológica, o crescimento celular torna-se de novo o processo dominante.

Após um período prolongado de limitação de carbono (“fome”), os microrganismos, quando expostos a elevadas concentrações de carbono (“fartura”), transformam a maior parte do substrato em reservas poliméricas internas e o restante em crescimento celular (Figura 2.3-2). Após a exaustão do substrato externo, as reservas internas podem ser usadas para crescimento e/ou manutenção celular.

Durante o período de limitação de carbono externo, a velocidade específica de crescimento atinge valores muito baixos, o que obriga o microrganismo a uma adaptação fisiológica na fase seguinte quando confrontado com um excesso de carbono disponível, resultando preferencialmente num mecanismo de acumulação de reservas em detrimento do crescimento celular.

Neste tipo de sistemas em condições dinâmicas de alimentação, os microrganismos que possuem a capacidade de acumular o substrato sob a forma de reservas intracelulares podem sobreviver durante a fase de ausência de carbono externo e, portanto, têm uma vantagem competitiva sobre os microrganismos que não possuem esta capacidade, tornando-se dominantes. A Figura 2.3-2 representa um ciclo de “fome” e “fartura”.

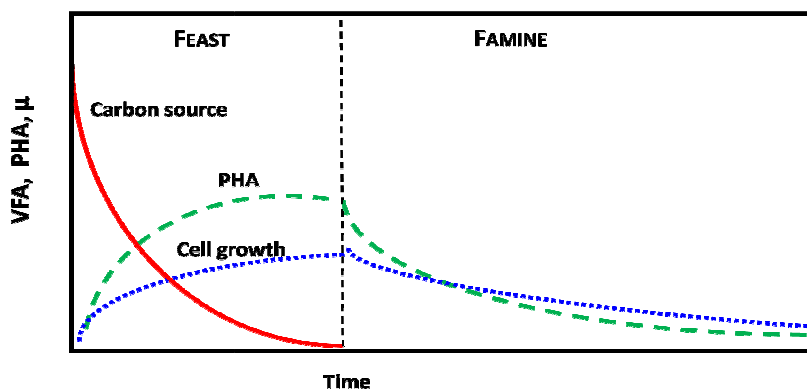


Figura 2.3-2: ADF ou (fome e fartura)

Para um desenvolvimento de um processo de produção de PHAs através de cultura mista de sucesso a selecção de culturas é habitualmente efectuada em SBR (sequencing batch reactor) ([Albuquerque *et al.*, 2007], [Albuquerque

et al., 2010], [Beccari *et al.*, 1998], [Beccari *et al.*, 2009], [Beun *et al.*, 2002], [Dionisi *et al.*, 2004], [Dionisi *et al.*, 2005], [Dionisi *et al.*, 2006], [Johnson *et al.*, 2009a], [Lemos *et al.*, 2006] e [Serafim *et al.*, 2004]).

O objectivo desta etapa é obter uma cultura altamente enriquecida em organismos com alta capacidade de armazenamento do PHA. Vários parâmetros operacionais como razão Fome e Fatura (F/F), tempo de retenção de lamas (TRL), carga orgânica, etc., influenciam a eficiência da etapa de selecção. Apesar do crescente número de trabalhos sobre produção de PHAs por culturas mistas, apenas alguns descrevem em detalhes o passo da selecção de culturas (e.g Beun *et al.*, 2002; Dionisi *et al.*, 2004, 2006a; Serafim *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2009).

2.3.2. Produção de PHAs

Nesta etapa a produção de PHAs é feita em modo descontínuo (Batch) com a cultura seleccionada na etapa 2 e o efluente fermentado produzido na etapa 1. Com o objectivo de maximizar quer o rendimento em polímero quer o conteúdo celular o ensaio é realizado sob condições limitadas de amónia.

Em geral, os resultados obtidos com matérias-primas complexas são menores do que aqueles obtidos por culturas mistas usando meios sintéticos.

Muitos valores elevados de produtividade específica estão relacionados com culturas mistas alimentadas com meio sintético, ou seja, com acetato como única fonte de carbono (até 1.37 g PHA CQO/ g CQO X.h, Johnson *et al.* 2009). No entanto, apesar de valores de produtividade específica elevada obtida por culturas mistas (utilizando meios sintéticos), as produtividades volumétricas ainda são consideravelmente inferiores aos obtidos com culturas puras, devido à menor concentração de biomassa geralmente alcançada nestes processos.

Quanto à utilização de substratos de baixo custo, foram demonstrados valores de produtividades muito mais baixos (no intervalo de 0,008 a 0,151 g

CQO PHA/gCQOX.h) comparado com a produção de PHAs utilizando meios sintéticos.

A caracterização dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por culturas mistas é fundamental para avaliar se estes polímeros apresentam o mesmo padrão de qualidade como a das produzidas por culturas puras. As propriedades dependem directamente da composição dos PHAs. Os co-polímeros de PHA variam no tipo e na proporção dos monómeros e tipicamente são aleatórios na sequência. A incorporação de diferentes tipos de monómeros reduz a cristalinidade do polímero por perturbar a rede cristalina. Os co-polímeros P(3HB-co-3HV) apresentam menor cristalinidade e propriedades melhoradas sobre o homopolímero P(3HB), como diminuição de rigidez e fragilidade, maior flexibilidade, aumento da resistência à tracção e dureza em relação ao homopolímero P(3HB), mantendo-se facilmente degradáveis. A composição dos PHAs produzidos por culturas mistas também dependem dos VFAs (como acetato, propionato, butirato e valerato) que compõem o substrato, quer se trate de um meio quimicamente definido ou de um efluente fermentado.

Em processos de produção de PHAs é muito importante a possibilidade de manipular a composição do polímero quer mexendo no perfil de VFAs do efluente (eg. Albuquerque *et al.* 2007), quer controlando directamente na etapa de produção.

O potencial de culturas microbianas mistas (MMC) para produção de PHA foi extensivamente investigado durante as últimas décadas (revisto por Dias *et al.*, 2006 e Serafim *et al.*, 2008) a fim de desenvolver recursos de baixo custo para a produção de PHA.

A maioria dos processos industriais produzem poli-3-hidroxibutirato P(3HB) puro. Isto deve-se ao facto de a maioria das estirpes microbiológicas produzirem apenas P(3HB) quando alimentadas apenas com açúcares. Alternativamente alguns processos industriais adicionam quantidades de ácidos orgânicos sintéticos relativamente pequenos, com o objectivo de obter co-polímeros em vez do homopolímero PHB.

Ao contrário dos processos de produção de PHAs com culturas puras, a maioria dos processos de PHAs usando MMC e efluentes fermentados como matéria-prima (contendo misturas de ácidos orgânicos como o acetato, propionato, butirato e valerato) produzem co-polímeros de PHAs contendo outros monómeros em vez de 3HB, como 3-hidroxivalerato (3HV) ou 3-hidroxihexanoato (3HHX). Nestes sistemas de produção de PHAs por culturas mistas, a composição dos biopolímeros depende directamente da composição do efluente fermentado produzido no passo da digestão anaeróbia. A produção de PHAs por MMC tem como vantagem a possibilidade de produzir co-polímeros de PHAs numa gama maior de composições que as geralmente obtidas com culturas puras a partir de açúcares. Estes co-polímeros apresentam em geral melhores propriedades mecânicas que o homopolímero de P(3HB).

2.4. Membranas de permuta aniónica e seu uso em downstream de fermentações

A separação de ácidos orgânicos numa solução aquosa é notoriamente um dos maiores problemas de separação, devido a grande afinidade que estes compostos têm pela água.

Membranas podem ser definidas como barreiras selectivas, entre duas fases, sendo utilizadas em processos de separação, visando o fraccionamento dos componentes de uma mistura, em função de suas diferentes velocidades de permeação (MULDER, 1992). Sob a influência de uma força motriz, certos componentes podem permear a membrana enquanto outros são retidos.

A característica que distingue membrana de troca iónica de outros tipos de membrana é a presença de grupos iónicos carregados ligados às cadeias principais do polímero formador da membrana (KESTING,R.E).

Podem ser identificados três variantes de transferência dialítica de ácidos através de uma membrana de troca aniónica (AEM) na ausência de uma corrente eléctrica (K.W.Böddeker):

A difusão usa água como agente de remoção e o gradiente de concentração do ácido como força motriz. A taxa de transporte do ácido é determinada pela taxa de transferência de protões, que está sujeita à exclusão do co-ião. Este tipo de técnica é usada para recuperar ácidos minerais a partir de soluções de sais.

O princípio de equilíbrio de Donnan usa uma solução de electrólitos como dialisado, permitindo uma interacção de iões através de uma membrana de troca aniónica (AEM) (R.M Wallace, G.Wisniewska, T.Winnicki). A velocidade de troca aniónica, que representa a velocidade com que os ácidos orgânicos são removidos, rege-se pelas concentrações relativas das espécies aniónicas na membrana somando-se à sua capacidade de troca iónica.

A velocidade de remoção de ácidos na forma aniónica pode ser descrita em termos de dois coeficientes de transporte empírico: a permeabilidade da camada limite (P_m), e a difusividade na membrana (D) (A. Zheleznov, D. Windmöller, S. Körner, K.W. Böddeker).

Na Figura 2.4-1 encontra-se representado o esquema do mecanismo de transporte de aniões numa membrana de troca aniónica. São dados como exemplos de aniões, os VFAs existentes no melaço fermentado.

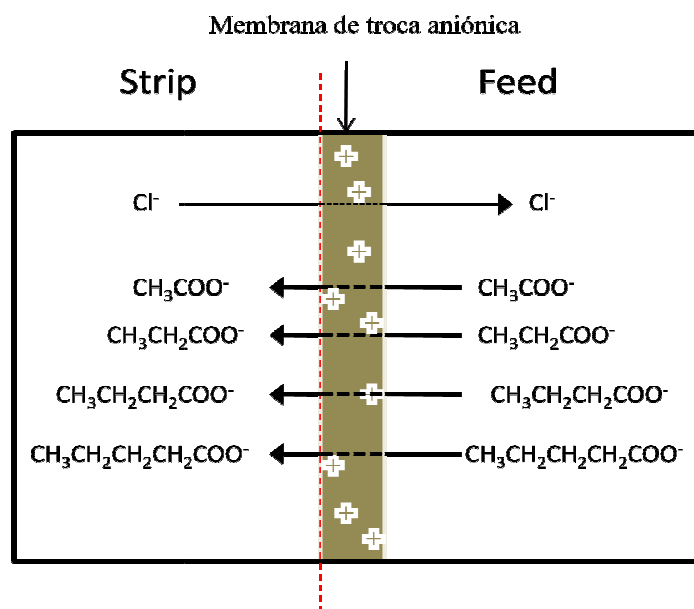


Figura 2.4-1: Mecanismo de transporte de aniões com uma membrana de troca aniônica

Tradicionalmente o sistema IEMB (Ion exchange membrane bioreactor) provou ser uma tecnologia eficiente para a remoção de nitratos e percloratos de águas poluídas usando uma membrana aniônica acoplada a um sistema biológico de remoção destes aniões poluentes.

Os iões poluentes presentes na água difundem-se através da membrana de troca aniônica passando para o compartimento biológico onde são imediatamente reduzidos a produtos inócuos por uma cultura biológica.

Os iões que apresentam a mesma carga que a superfície da membrana (co-iões) estão sujeitos a uma repulsão electrostática (exclusão de Donnan), consequentemente, o transporte de co-iões através da membrana é desprezável. Por outro lado o transporte dos poluentes iónicos da corrente de água para o compartimento biológico é apenas possível se existir transporte em sentido inverso de um ião, não poluente, que é adicionado ao compartimento biológico (contra-ião), conservando-se assim a electro-neutralidade em cada compartimento.

3. Objectivo da tese

Partiu-se de um processo de produção de PHAs por culturas mistas a partir de melaço que é constituído por três etapas: (1) fermentação acidogénica do melaço a VFA, (2) selecção de culturas em organismos acumuladores de PHAs em fome/fartura usando melaço fermentado e (3) a produção de polímero usando a cultura seleccionada em (2) e o melaço fermentado produzido em (1).

Esta tese teve como objectivo o melhoramento deste processo, abordando duas questões essenciais:

- 1- Aumentar a produtividade volumétrica que é baixa devido à baixa concentração celular;
- 2- Possibilidade de melhorar o grau de controlo sobre a manipulação da composição dos polímeros: não ficar apenas dependente da fermentação do melaço.

Estes objectivos foram realizados da seguinte forma:

1 - Estudando em 1º lugar a etapa de produção de PHAs, estudando o efeito do perfil de VFAs e do regime de alimentação (pulsos ou contínuo) e o efeito destas duas variáveis quer na produtividade, quer na composição dos polímeros.

2 – Investigando a possibilidade de se usar uma membrana de permuta aniónica para fazer o transporte de VFAs ao reactor de produção.

Um sistema integrado de membrana aniónica + reactor biológico de produção de PHAs permitiria: 1 – diminuir o volume do reactor já que apenas os VFAs seriam transportados e não a fracção hidráulica – isto permitiria aumentar a concentração celular e a produtividade volumétrica da etapa de produção; 2 – para, além disso, permitirá também eventualmente possibilitar uma alimentação controlada de uns ácidos em detrimento de outros através de uma passagem selectiva através da membrana, que se reflectiria numa possibilidade de manipular pelo transporte a composição do polímero.

4. Materiais e métodos

4.1. Produção de PHAs por uma cultura mista a partir do melaço da cana

4.1.1. Meios

Etapa1: Solução de melaço

O melaço usado foi obtido de uma fábrica de produção de açúcar (Refinaria de Açúcares Reunida, Porto). Este contém um teor de açúcar bastante elevado (açúcares totais representam 54%w/w do melaço de cana). O melaço foi diluído (1:3) para reduzir a viscosidade e para permitir que este fosse bombeado. Foi usado para fazer a solução de alimentação do reator CSTR (410 g de melaço por litro de forma a ter uma concentração de açúcares no “feed” de 220 g/L) o que perfaz uma concentração à entrada do reator de 10 g/L de açúcares. A solução de nutrientes usado no reator CSTR contém nitrogénio (NH_4Cl) e Fósforo (KH_2PO_4) em concentrações de 21 Nmmol/L e 2 Pmmol/L respectivamente.

Etapa 2: Solução de melaço fermentado

O SBR foi alimentado com o fermentado de melaço produzido na etapa 1 (concentração de VFA com cerca de 180 Cmmol VFA/L) foi diluído de modo a ter uma concentração inicial dos ciclos de SBR de 45 Cmmol VFA/L.

A solução de nutrientes, contendo uma fonte de NH_4Cl e KH_2PO_4 , foi adicionada ao reator com vista a ter uma concentração inicial no reator de 3,75Nmmol/L e 0,48 Pmmol/L, respectivamente.

A Thiourea também foi adicionada a solução mineral de nutrientes com vista a inibir a nitrificação.

Etapa 3: Solução de melaço fermentado ou misturas de VFAs sintéticos

Foi usada uma solução de misturas de VFAs sintéticos simulando o fermentado de melaço com o objectivo de verificar se estes podem prever com precisão o que seria obtido com melaço fermentado.

4.1.2. Sistema experimental

O processo de produção de PHA em estudo possuía 3 etapas distintas. O sistema experimental era por isso constituído por três reactores e um módulo de membranas de microfiltração de fibras ocas (Figura 2.3-1). A “fermentação acidogénica do melaço” (1ª etapa) era efectuada num reactor continuamente agitado (CSTR) alimentado em contínuo e operado em condições anaeróbias. O efluente do reactor era então clarificado através de uma membrana de microfiltração e o melaço fermentado clarificado é usado como matéria-prima para a selecção da cultura (2ª etapa) e acumulação de PHAs em batch (3ª etapa). A selecção de uma cultura acumuladora de PHAs (2ª etapa) era realizada num reactor descontínuo sequencial (SBR) em condições de Fome e Fartura. A produção de PHAs (3ª etapa) ocorre num reactor operado em modo descontínuo (batch) inoculado com a cultura enriquecida em SBR e alimentada com melaço fermentado produzido na 1ª etapa.

O estudo desenvolvido incidiu sobre a 3ª etapa do processo, tendo-se procedido a diferentes ensaios em batch com várias soluções de alimentação (fermentado de melaço e meios sintéticos) e diferentes regimes de alimentação (pulsos vs contínuo).

4.1.3. Produção de PHAs

Foram realizados diferentes ensaios de acumulação de PHAs com o objectivo de investigar o efeito da composição do substrato e do regime de alimentação na produtividade e composição do polímero.

Estes ensaios foram realizados num reactor com um volume de 2 L (B.Braun) (volume inicial de 1.1L), operado em modo descontínuo inoculado com a cultura enriquecida em SBR e alimentado quer com melaço fermentado quer com meios quimicamente definidos simulando a composição em ácidos orgânicos voláteis (VFAs) do melaço fermentado. O pH da solução de alimentação (fermentado de melaço ou meio sintético) foi ajustado a 8 antes da adição do meio ao reactor. Com o objectivo de maximizar a acumulação de PHAs os ensaios foram realizados em condições de concentração de amónia limitante (nenhuma amónia foi adicionada e a concentração residual de amónia na biomassa recolhida do SBR foi sempre inferior a 0,1Nmmol/L). O arejamento foi mantido a 400 ml/min e agitação a 300 rpm. O reactor foi mantido numa sala com temperatura controlada (23-25°C). O reactor foi equipado com dois medidores de caudal mássico de gases (Smart MassFlow 5850S, Brooks Instruments) para medir o caudal de entrada e saída de ar. A concentração de O₂ no gás de escape foi medida com um analisador de gases (Tandem, Magellan Instruments).

De forma a aferir o efeito da composição do substrato na composição do polímero, usaram-se três misturas de VFAs sintéticos, cujas composições foram designadas por perfil A (acetato, propionato, butirato e valerato em fracções de 30/20/30/20 Cmol/100Cmol VFA), perfil B (acetato, propionato, butirato e valerato em fracções de 60/15/20/05 Cmol/100Cmol VFA) e perfil C (acetato, propionato, butirato e valerato em fracções de 60/10/25/05 Cmol/100 Cmol VFA), correspondendo os dois primeiros, respectivamente, à composição do melaço fermentado obtido operando o CSTR a pH 5 e 6 (Albuquerque *et al.* 2007) e o último ao perfil do melaço fermentado usado para operar o reactor de selecção de cultura. O perfil C foi testado quer como meio simulado, quer sob a forma de melaço fermentado (ensaios C1 e C2, respectivamente).

O efeito do regime de alimentação na produtividade e composição do polímero foi também investigado, tendo-se efectuado três ensaios com perfil de VFAs semelhante, perfil A. No primeiro e segundo ensaios (A1 e A2), a alimentação ao reactor foi efectuada por pulsos, tal como havia sido anteriormente descrito em Albuquerque *et al.*, 2007 e 2010, ao passo que no terceiro ensaio (A3) foi usada alimentação em contínuo. Este tipo de alimentação foi levado a cabo, iniciando o ensaio com um pulso de substrato (60 Cmmol VFA/L) e fazendo a restante a adição de meio por controlo de pH (usando como solução ácida para acerto de pH o próprio meio de alimentação).

Uma vez que o primeiro ensaio por pulsos (A1) foi levado a cabo sem controlo de pH, enquanto que o terceiro ensaio (A3) foi efectuado com controlo de pH (como forma de fazer a adição contínua do meio), julgou-se necessário testar também o efeito do controlo de pH. Para tal, o segundo ensaio (A2) foi efectuado com alimentação por pulsos e pH controlado (com HCl 2M). A2 e A3 foram levados a cabo com pH controlado a 8.2 e 8.4, respectivamente.

Nos três ensaios, foi usada uma solução de alimentação de elevada concentração (1000 Cmmol VFA/L) de forma a minimizar a diluição resultante da adição do substrato.

4.2. Métodos analíticos

A concentração da biomassa foi determinada usando o método para determinação de sólidos suspensos voláteis (VSS), descrito em standard Methods (APHA 1995).

A concentração de ácidos orgânicos voláteis (VFAs), nomeadamente, ácidos acético, propiónico, butírico e valérico foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um cromatógrafo Merck-Hitachi equipado com detector IR e uma coluna BioRad (Aminex HPX-87H)(USA). As condições de corrida foram: eluente, ácido sulfúrico 0,01N, com um caudal de 0,6 ml/min e uma temperatura de 50°C. As concentrações dos vários ácidos orgânicos foram calculadas por meio de rectas de calibração efectuadas para cada ácido, usando padrões entre 25 - 1000 mg/L.

A concentração de amónia foi determinada usando uma combinação de detecção de gás amónia eléctrodo ThermoOrion 9512. A curva de calibração foi obtida com os padrões de NH_4Cl (0,01-10 Nmmol/L).

A concentração de polihidroxialcanoatos (PHAs) foi determinada por cromatografia em fase gasosa (GC) utilizando o método descrito em Albuquerque *et al.* (2010b). As concentrações de Hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) foram calculadas utilizando rectas de calibração para os monómeros HB e HV obtidas usando soluções de concentração conhecida destes monómeros preparadas a partir de um padrão de – P- (HB-co-HV) (88% / 12%) (Sigma), e corrigida usando um padrão interno de heptadecano.

4.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de PHAs

O teor de polímero contido na biomassa foi calculado de acordo com a expressão ($\%PHA = g\ PHA/g\ VSS \cdot 100$), onde os sólidos suspensos voláteis (VSS) incluem biomassa activa (X) e PHA. A concentração de biomassa activa foi calculada subtraindo a concentração de PHAs do valor de VSS medido. A velocidade específica de consumo máximo de substrato ($-q_s$ em $Cmol\ VFA/Cmol\ X \cdot h$) e a velocidade de acumulação de PHAs (q_p em $Cmol\ PHA/Cmol\ X \cdot h$) foram determinadas por ajuste de uma função linear aos dados experimentais de concentrações de VFAs e de PHAs, respectivamente traçadas ao longo do tempo, calculando a primeira derivada no tempo zero (declive da recta) e dividindo o valor assim obtido pela concentração de biomassa activa nesse ponto.

A concentração de VFAs corresponde à soma de todas as concentrações de ácidos orgânicos (VFAs, em $Cmmol/L$, é igual a $\Sigma\ HAc, HProp, HBut, HVal$ em $Cmmol/L$). A concentração de PHAs (em $Cmmol/L$) corresponde à soma das concentrações dos monómeros de HB e HV (em $Cmmol/L$).

O rendimento de PHAs ($Y_{PHA/VFA}$ em $Cmol\ PHA/Cmol\ VFA$) por quantidade de substrato consumido foi calculado dividindo a quantidade de PHAs formada pela quantidade de ácidos orgânicos consumidos.

4.4. Transporte dos ácidos na membrana de troca iónica

O estudo do transporte de ácidos orgânicos voláteis através de uma membrana de permuta aniónica ocorreu numa célula de difusão, composta por dois compartimentos agitados (designados por “Feed” e “Strip”), de 140 ml cada, separados por uma membrana de troca aniónica (Figura 2.4-1). A agitação foi de 700 rpm em cada compartimento e a célula foi mantida a temperatura ambiente.

Foram usadas membranas do tipo Fumasep FTAM e membrana 100Da. Antes de serem usadas, as membranas foram mantidas em solução de NaCl com a mesma concentração do contra ião usado no ensaio (0,1 a 0,5M).

Efectuaram-se ensaios de transporte em modo descontínuo com duração de 3 a 7 dias (pelo menos até se atingir o equilíbrio químico). A célula foi carregada no compartimento da alimentação com solução de fermentado de melaço clarificada ou misturas de VFAs sintéticos e no compartimento do “Strip” com uma solução de ião cloreto (0,1 a 0,5 M) para servir como contra-ião. Durante cada ensaio recolheram-se amostras em cada um dos dois compartimentos a intervalos regulares (cerca de 1 ml duas vezes por dia).

Estes ensaios foram levados a cabo para: 1) seleccionar a membrana (Fumasep FTAM ou a 100Da); aferir o efeito da concentração do contra ião (cloreto); testar o efeito do fouling na membrana seleccionada; 4) Estudar a permeabilidade da membrana (usando uma mistura equimolar de VFAs em vez da solução de fermentado de melaço em que cada um dos ácidos orgânicos está em concentração diferente); 5) Testar a concentração de contra-ião cloreto (0,1M e 0,5M) e por último 6) aferir o efeito de possíveis aniões competidores (Tabela 4.4-1). Os ensaios foram efectuados com soluções de VFAs (melaço fermentado ou misturas sintéticas) com pH entre 4 e 8. O ensaio de mistura equimolar foi necessário acertar o pH (6) com uma solução de NaOH 4M.

No início e no fim de cada ensaio foram medidos o pH, a condutividade e o volume de ambos os compartimentos.

Tabela 4.4-1: Resumo dos ensaios de transporte de ácidos carboxílicos numa membrana de permuta iónica, usando fermentado de melaço ou simulado (com diferentes composições de VFAs, contra-íão e membranas).

Estudos				Ensaio	Feed	pH _i /cond (ms/cm)	pH _f /cond (ms/cm)	Membrana	Strip	pH _i /cond (ms/cm)	pH _f /cond (ms/cm)
Seleção de membrana (1 versus 2)	Estudo do fouling na membrana selecionada (2 versus 3)	Efeito da concentração contra-ção (2 versus 4)	1	Melaço fermentado 224 Cmmol/LVFA	pH _i =5,30	pH _f =5,1	100 Da	NaCl 0,5M	pH _i = 5,7	pH _f =5,58	
					λ _i = 8,07 ms/cm	λ _f =18,37 ms/cm			λ _i = 46,1 ms/cm	λ _f =34,1 ms/cm	
			2	Melaço fermentado 257 Cmmol/LVFA	pH _i =5,34	pH _f = 5,2	FUMASEP FTAM	NaCl 0,5M	pH _i = 6,14	pH _f = 6,02	
					λ _i = 8,23 ms/cm	λ _f =10,9 ms/cm			λ _i = 45,6 ms/cm	λ _f = 43 ms/cm	
			3	Melaço fermentado 129 Cmmol/LVFA	pH _i =7,63	pH _f = 7,8	FUMASEP FTAM usado	NaCl 0,5M	pH _i = 6,57	pH _f = 8,5	
					λ _i = 9,79 ms/cm	λ _f =14,34 ms/cm			λ _i = 45,9 ms/cm	λ _f = 40,3 ms/cm	
	Efeito dos iões competidores (4, 5 e 6)	Efeito da conc. dos VFAs	Efeito dos iões competidores (4, 5 e 6)	4	Melaço fermentado 174 Cmmol/LVFA	pH _i =5,58	pH _f = 7,07	FUMASEP FTAM	NaCl 0,1M	pH _i = 6,28	pH _f = 6,0
						λ _i = 7,34 ms/cm	λ _f =8,35 ms/cm			λ _i = 10,65 ms/cm	λ _f = 9,78 ms/cm
				5	Melaço fermentado 175 Cmmol/LVFA	pH _i = 5,89	pH _f =4,5	FUMASEP T FTAM	NaCl 0,1M + aniões*	pH _i = 5,75	pH _f =6,8
		λ _i = 7,52 ms/cm	λ _f =8,12 ms/cm			λ _i =14,61 ms/cm	λ _f =14,21 ms/cm				
		6	VFAs sintéticos/ aniões 174 Cmmol/LVFA	pH _i = 4,46	pH _f = 4,34	FUMASEP FTAM	NaCl 0,1M / aniões**	pH _i = 5,28	pH _f = 6,06		
				λ _i = 5,76 ms/cm	λ _f = 6,40 ms/cm			λ _i =14,99 ms/cm	λ _f =14,33 ms/cm		
		7	Hac -160 mmol/L Hbut – 90,2 mmol/L Hprop-77,9 mmol/L Hval -74,4 mmol/L	pH _i = 6,0	pH _f =5,94	FUMASEP FTAM	NaCl 1 M	pH _i = 5,58	pH _f = 6,23		
	λ = 19,66 ms/cm							λ _f = 26,7 ms/cm	λ _i =86,1 ms/cm	λ _f = 77,1 ms/cm	

* Cl⁻, NO₃⁻, SO₂⁻, PO₃⁻ em concentrações de 48, 0.3, 0.2 e 2.6 mmol/L respectivamente

** Cl⁻, NO₃⁻, SO₂⁻, PO₃⁻ em concentrações de 78.68, 008, 0.44 e 2.25 mmol/L respectivamente

4.5. Métodos analíticos para monitorizar estudo de transporte de VFAs

A concentração dos VFAs, nomeadamente, ácidos, acético, propiónico, butírico e valérico foram determinados como descrito na secção 4.2.

A concentração de aniões inorgânicos, nomeadamente cloretos (Cl^-), fosfatos (PO_4^{2-}), sulfatos (SO_4^{2-}) e nitratos (NO_3^{2-}), foram determinadas por cromatografia de troca iónica usando um cromatógrafo da marca Dionex constituído por injector, bomba, coluna Dionex (colunas AS9) e detector electroquímico ED 50. As condições de corrida foram: corrente do supressor de 50mA, eluente Na_2CO_3 9mM, range 200 μs . As concentrações dos diferentes aniões foram calculadas por meio de curvas de calibração, determinadas para cada um dos aniões usando padrões entre 250 - 1000 mg/L.

4.6. Cálculos de fluxo, permeabilidade e outros parâmetros associados ao transporte de VFAs através de membranas

O fluxo ($\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) através da membrana foi determinado experimentalmente pela seguinte expressão ($J_i = -(V/A) \cdot dC'_i/dt$) em que $V(\text{L})$ é o volume da alimentação, $A (\text{cm}^2)$ é a área da membrana e $dC'_i/dt (\text{mmol}/\text{L} \cdot \text{h})$ é taxa de variação da concentração do componente i na alimentação ao longo do tempo.

Para o cálculo da permeabilidade, uma vez que se trata de uma membrana com carga, o transporte é conduzido pelo princípio de equilíbrio de Donnan em que este se relaciona com o fluxo através da seguinte expressão: ($J = P_{\text{HA}} \cdot Q((C_{\text{HA}}/C_{\text{Cl}^-})_{\text{feed}} - (C_{\text{HA}}/C_{\text{Cl}^-})_{\text{strip}})/l$), em que $Q (\text{mmol}/\text{cm}^3)$ é a capacidade de troca iônica da membrana, $P_{\text{HA}} (\text{cm}^2/\text{s})$ é a permeabilidade do ácido na membrana, $l(\text{cm})$ é a espessura da membrana, $C_{\text{HA}} (\text{mmol}/\text{cm}^3)$ é a concentração do ácido e $C_{\text{Cl}^-} (\text{mmol}/\text{cm}^3)$ concentração do contra-íon no “feed” e no “strip”. No entanto a concentração do ácido do lado do “strip” no início é aproximadamente igual a zero, o que nos permite ter uma equação do tipo ($J = P_{\text{HA}} \cdot Q((C_{\text{HA}}/C_{\text{Cl}^-})_{\text{feed}})$).

5. Resultados

5.1 Estratégias para optimização da produção de PHAs por uma cultura mista enriquecida usando melaço fermentado como fonte de carbono

5.1.1. Efeito do perfil de VFAs na produção de PHAs (rendimento e composição do polímero)

Um aspecto importante na optimização de sistemas MMC para produção de PHAs, particularmente a partir de matérias-primas complexas (como efluentes fermentados), está relacionado com a possibilidade de manipular a composição do polímero na etapa de acumulação. Foi demonstrado anteriormente que o perfil de VFAs do melaço fermentado pode ser manipulado através do pH de fermentação acidogénica (Albuquerque *et al.*,2007).

No estudo referido, os autores usaram quer melaço fermentado (com diferentes perfis de VFAs) quer misturas de VFAs sintéticos (simulando o melaço fermentado) para a produção de PHAs por uma cultura mista seleccionada usando acetato como fonte de carbono.

Assim, no presente estudo, usaram-se diferentes misturas de VFAs sintéticos (A, B e C), (Tabela 5.1-1) como substrato para produção de PHAs em modo descontínuo por uma cultura enriquecida em condições de fome e fartura (usando melaço fermentado como fonte de carbono) a fim de desenvolver a possibilidade de controlar a composição do polímero e as respectivas propriedades, simplesmente através da manipulação das condições de fermentação do melaço.

Foram efectuados três ensaios com mistura de VFAs sintéticos (simulando melaço fermentado) (A1, B1 e C1), cujos perfis de VFAs simulam os obtidos a diferentes valores de pH (5-7) no reactor acidogénico (Albuquerque *et al.*,2007). Foi feito ainda um ensaio com melaço fermentado real com o objectivo de confirmar que a matrix do melaço não irá apresentar variações significativas no resultado final.

Em termos de eficiência de acumulação de PHAs, foram alcançados conteúdos máximos de PHAs entre 56 e 77%, o primeiro com melaço fermentado e o último com meio sintético. No entanto, é importante ressaltar que o último ensaio foi levado a cabo até se observar a saturação da síntese de PHAs, enquanto que o ensaio usando melaço fermentado não. Devido às diferenças nas velocidades de consumo de substrato e de síntese de PHAs, o ensaio com melaço fermentado demora mais tempo a atingir a saturação do que os ensaios efectuados com misturas de VFA sintéticos, justificando assim as diferenças observadas no conteúdo máximo de PHAs atingido. Apesar do menor valor obtido com melaço fermentado, este é ainda um valor relativamente alto para matérias-primas fermentadas (55% foram atingidos por Dionisi *et al.* 2005 usando efluentes de lagares, 54% por Bengtsson *et al.*, 2008, usando efluentes de pasta de papel e 32 - 37% por Bengtsson *et al.*, 2010 usando melaço fermentado).

Foram obtidos também rendimentos de PHAs por substrato muito elevados entre 0,74 - 0,80 Cmol PHA/Cmol VFA, em que o maior valores foi para o ensaio com melaço fermentado.

Tabela 5.1-1: Resumo dos testes realizados em batch alimentando a cultura enriquecida do reactor SBR (seleccionados usando melaço fermentado como materia-prima) com ambas usando melaço fermentado real ou simulado (com diferentes composições de VFAs: A, B e C) usando alimentação por pulsos ou alimentação contínua.

Batch	Matéria-prima	Perfil de VFA Hac/Hprop/Hbut/Hval em Cmol/100 Cmol VFA		Regime de alimentação	Controle de pH	Y _{PHA} /VFA (Cmol/Cmol)	Teor em PHA (%)	Composição de PHA (%HB;%HV)
A1	Melaço fermentado simulado	A	32/19/28/21	Pulso	Não 8.3 – 8.9	0.77 (0.07; 18); 0.53** (0.13; 26)	65 (4)	69 (1.7; 12): 31(1.7;12)
A2			30/20/28/22		Sim 8.2	0.78 (0.05; 13); 0.51** (0.14; 22)	65 (4)	70 (1.2; 13): 30 (1.2; 13)
A3*			31/18/29/22	Contínua	Sim 8.4	0.80 (0.02; 10)	77 (3)	61 (0.3; 10): 39 (0.3; 10)
B1*		B	60/16/20/04	Pulso	Não 8.2 – 9.0	0.74 (0.07; 16); 0.59** (0.12; 24)	68 (6)	80 (1.8; 10): 20 (1.8; 10)
C1		C	59/09/26/06	Pulso	Não 8.3 – 9.0	0.75 (0.04; 15); 0.57** (0.12; 19)	66 (5)	83 (1.2; 11): 17 (1.2; 11)
C2*	Melaço fermentado		60/09/25/06	Pulso	Não 8.4 – 9.1	0.80 (0.07; 22); 0.65** (0.15; 27)	56 (4)	85 (0.8; 18): 15 (0.8;18)

*Amostras (A3, B1 e C2) foram caracterizados em termos de estrutura e propriedades térmicas

** Os rendimentos do polímero no substrato foram calculados contabilizando todos os PHAs formados (soma de PHA formados em cada pulso) e também considerando as diferenças entre concentração inicial e final do PHA. O valor é dado na linha inferior e é menor do que o primeiro devido ao consumo de PHA durante as paragens entre os pulsos.

Em todos os casos, foram obtidos co-polímeros de hidroxibutirato e hidroxivalerato (confirmado pela curva unimodal no SEC). O conteúdo em HV variou de 15 a 31 % em função da quantidade de VFAs com o número ímpar de átomos de carbono, (propionato e valerato) na alimentação (que variou de 15 a 40 % Cmol/Cmol VFA) (Tabela 5.1-1). Estes resultados estão de acordo com o que foi anteriormente descrito por Albuquerque *et al.*, 2007 para uma cultura seleccionada com acetato em ensaios de produção de PHAs melaço fermentado (obtidos a diferentes valores de pH na fermentação acidogénica (ou seja, diferentes perfis de VFAs). Está também de acordo com os resultados descritos por Bengtsson *et al.*, (2010) que obtém co-polímeros contendo 5 tipos de monómeros, nomeadamente, 3-hidroxibutirato(3HB), 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxi-2-metilbutirato (3H2MB), 3-hidroxi-2-metilvalerato (3H2MV) e o monómero de cadeia média 3-hidroxihexanoato (3HHx) a partir de melaço fermentado com diferentes perfis de VFA.

Um resultado interessante é que a composição do polímero não é significativamente afectada pelo uso do melaço fermentado real em vez do meio sintético (Tabela 5.1-1). Isto indica que a matrix do melaço não resulta numa variação significativa na composição do polímero. O rendimento de PHAs em VFAs foi ligeiramente superior com o melaço fermentado, possivelmente devido à presença de outras fontes de carbono (que não VFAs) existentes no melaço fermentado e que podem ter sido usadas para síntese de PHAs.

O teor de HV obtido a partir de melaço fermentado (15%) foi ligeiramente inferior relativamente ao obtido com mistura de VFAs sintéticos (17%), o que, pode indicar que esta fracção orgânica residual contribui para o teor em HB do co-polímero. O menor teor máximo de PHA (56%) obtido com o melaço fermentado comparado com o produzido a partir de alimentação simulada (66%) deve-se às velocidades ligeiramente menores de consumo de substrato e de armazenamento de PHAs com o efluente real. Para um tempo de fermentação semelhante, o fermentado de melaço resultou num teor mais baixo de polímero, pois este ensaio não chegou a atingir a saturação. Estes resultados mostram que embora a matrix do melaço tenha um pequeno impacto sobre o desempenho cinético, não influencia significativamente nem o rendimento, nem a composição do polímero e assim, os resultados obtidos nos

restantes testes (em termos de composição e propriedades dos polímeros) podem ser usados para prever resultados possíveis quando usado melaço fermentado real.

5.1.2. Efeito do regime de alimentação na produtividade

Em estudos anteriores de acumulação de PHAs em batch usando melaço fermentado (Albuquerque *et al.*, 2007, 2010 a,b), a adição de múltiplos pulsos de substrato fermentado foi usada como estratégia de alimentação a fim de superar eventual inibição pelo substrato (demonstrada em Serafim *et al.*, 2004 e Albuquerque *et al.*, 2007). No entanto, esta estratégia de alimentação representa uma limitação no que diz respeito à produtividade do processo. O elevado número de pulsos fornecidos (devido ao facto de se verificar inibição pelo substrato a partir de concentrações relativamente baixas, aproximadamente 90 Cmmol VFA/L Albuquerque *et al.*, 2007) e a necessidade de fornecer um volume considerável de solução de alimentação para cada novo pulso (devido ao facto das concentrações de VFAs no melaço fermentados serem relativamente baixas, comparadas com um “feed” sintético, por exemplo) resulta numa perda considerável de produtividade.

Para, além disso, para cada pulso, a reacção tem que ser interrompida, a biomassa decantada, retirado o sobrenadante e alimentado o novo meio (isto devido ao volume a adicionar ser cerca de 1/3 a 1/2 do volume do reactor), o que resulta em paragens entre pulsos e algum consumo parcial dos PHAs sintetizados entre pulsos consecutivos. Um dos objectivos deste estudo foi por isso avaliar a utilização de uma estratégia de alimentação em contínuo para a fase de produção de PHAs a fim de superar as limitações associadas com a alimentação por pulsos.

A alimentação em contínuo foi realizada usando a solução de alimentação (mistura sintética de VFAs A) como solução ácida de acerto de pH. Neste ensaio, A3, a adição contínua de substrato foi realizada pelo fornecimento de

um primeiro pulso da solução de alimentação (60 Cmmol VFA/L) e de seguida, mantendo o pH controlado (a 8,4) pela adição contínua da alimentação de VFA (pH - stat). Foram efectuados dois controlos: o primeiro, A1, usando a estratégia habitual de alimentação por pulsos sem controlo de pH; por outro lado, efectuou-se um segundo controlo, A2, em que se usou igualmente uma alimentação por pulsos mas com controlo de pH (usando uma solução de HCl 2 M), de forma a aferir o efeito do controlo de pH na produtividade e composição do polímero.

Os parâmetros cinéticos e estequiométricos observados nos três ensaios (A1, A2, A3) encontram-se na Tabela 5.1-2. Os resultados do ensaio de alimentação contínua (A3) são comparados com os ensaios de alimentação por pulsos A1 e A2.

Os resultados mostram que o controle de pH não tem efeito significativo no rendimento de polímero por quantidade de substrato, nem na sua composição e ou teor máximo em PHAs, sugerindo por isso que as diferenças observadas no ensaio A3 serão associadas à alimentação em contínuo e não ao controlo de pH.

Tabela 5.1-2: Parâmetros estequiométricos e cinéticos de armazenamento de PHA em função do regime alimentar e controle de pH

	Regime de alimentação	Control de pH	Alimentação substrato (Cmmol VFA/L)	Perfil de VFA *	Factor de diluição	VSS (g/L)	PHA (%)	Composição PHA (%HB: %HV)	$Y_{PHA/VFA}$ (Cmol PHA/Cmol VFA)	$-q_s^{***}$	q_p^{***}
A1	Pulso	Não (8.3-8.9)	469	32/19/28/21	1.0	6.3 (0.03)	65 (4)	69-31 (1.7;12)	0.77 (0.02)/0.53 (0.01)**	0.32 (0.006)	0.20 (0.010)
A2	Pulso	Sim 8.2	254	30/20/28/22	1.0	4.0 (0.02)	65 (4)	70-30 (1.2;13)	0.78 (0.02)/0.51 (0.01)**	0.35 (0.005)	0.17 (0.007)
A3	Contínuo	Sim 8.4	497	31/18/29/22	1.4	6.8 (0.03)	77 (3)	61-39 (0.3;10)	0.80 (0.02)	0.47 (0.005)	0.26 (0.008)

(*st dev*; *numero da amostra*); (erro associado com a lista de valores).

* Perfil de VFA de HAc/HProp/HBut/HVal em fracções de Cmol/100 Cmol VFA

** Rendimentos de polímero no substrato foram calculados contabilizando todos os PHAs formados (soma de todos os PHAs formados em cada pulso) e também considerando a diferença entre a concentração inicial e final de PHA. O valor é dado mais tarde, na linha inferior e é menor do que o primeiro devido ao consumo de PHA durante as paragens entre os pulsos.

*** - q_s e q_p são as velocidades médias específicas de consumo e armazenamento de PHA, em Cmol VFA/Cmol X.h e Cmol PHA/Cmol X.h, respectivamente, calculados para o batch inteiro.

A Figura 5.1-1 – (a) mostra a produção de PHAs usando alimentação por pulsos sem controle de pH. Neste ensaio, paragens entre os pulsos representam cerca de 16 % da duração total do ensaio e o consumo parcial de PHAs sintetizados representa cerca de 33% dos PHAs formados. O consumo de PHA formado reduziu o rendimento global de PHA por substrato de 0,77 Cmol PHA/Cmol VFA (se todos os PHAs forem contabilizados) para 0.53 Cmol PHA/Cmol VFA. A perda de tempo e o consumo de polímero resultou numa perda de 43% da produtividade volumétrica relativamente ao que seria obtido se as paragens entre os pulsos tivessem sido evitadas.

Foi também observado, que para cada pulso de substrato alimentado, as velocidades de consumo de substrato e de armazenamento de PHAs foram máximas no início do pulso, mas à medida que os substratos se foram esgotando estas taxas também diminuíram (diminuição de 30 e 35% para a velocidade de consumo de substrato e de armazenamento de PHAs, respectivamente).

A dependência das taxas de velocidade de consumo de substrato e armazenamento de PHA em função da concentração do substrato foi anteriormente reportada para os ciclos de funcionamento de um reactor de enriquecimento de uma cultura acumuladora de PHAs (Albuquerque *et al.*, 2010 a,b), caso em que uma constante de afinidade (K_s) de cerca de 18,5 Cmmol VFA/L foi observada (Albuquerque *et al.*, 2010b).

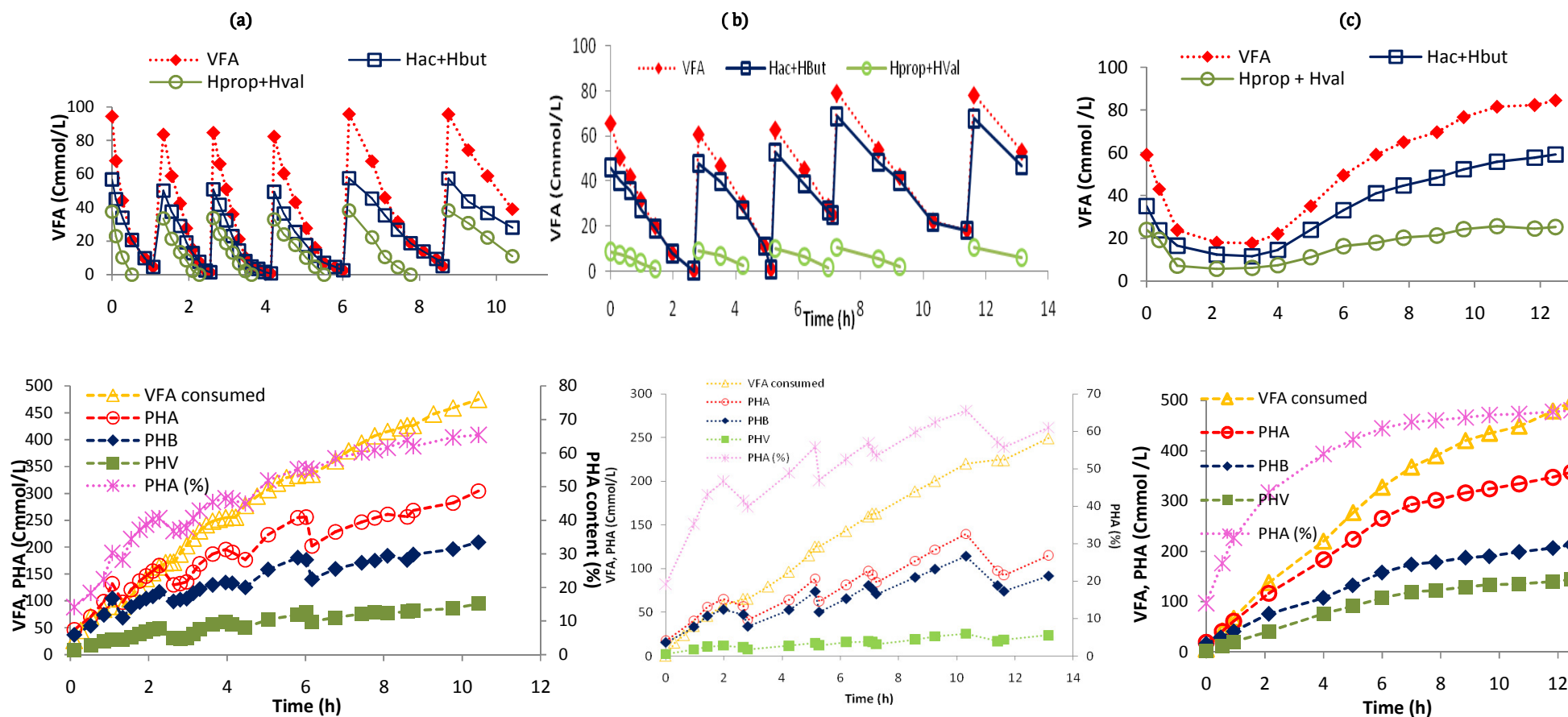


Figura 5.1-1: Ensaio de acumulação em Batch com misturas de VFA: (a) Alimentação por pulsos A1, (b) Alimentação por pulsos A2 e (c) Alimentação em contínuo A3

A Figura 5.1-1 (c) mostra os resultados do ensaio de alimentação em contínuo (A3). Esta estratégia demonstrou uma melhoria considerável no desempenho de acumulação de PHAs relativamente a ambos os ensaios de alimentação por pulsos usando o mesmo meio (A1 e A2). No ensaio A3, a máxima velocidade de consumo de substrato específico (0.64 Cmol VFA/Cmol X.h) e acumulação de PHA (0.46 e 0.43 Cmol VFA/Cmol X.h e 0.31 e 0.35 Cmol PHA/Cmol X.h, em A1 e A2, respectivamente).

Este melhor desempenho deve-se, por um lado, às concentrações iniciais de substrato (60 Cmmol VFA/L usado para A3 em vez de 80 Cmmol VFA/L usado em A1 e A2). Mas o que é ainda mais significativo é que a estratégia de alimentação em contínuo permitiu que as taxas de velocidade de consumo de substrato específico e de acumulação de PHA ficassem muito próximas do nível máximo (inicial), até cerca das 6h de ensaio (0.54 Cmol VFA/Cmol X.h e 0.39 Cmol PHA/Cmol X.h, respectivamente), ponto em que a cultura já tinha alcançado um teor de 72% em PHA. Após este ponto, a taxa de velocidade de consumo de substrato e acumulação de PHA diminuíram, mas devido à aproximação do nível de saturação, o que fez com que as velocidades específicas médias determinadas para o ensaio A3 (velocidade de consumo de substrato de 0.47 Cmol VFA/Cmol X.h e acumulação de PHA 0.26 Cmol PHA/Cmol X.h), (Tabela 5.1-2) diminuam relativamente às taxas observadas às 6h de ensaio. No entanto, estas taxas médias, são ainda consideravelmente maiores que as taxas de ambos os ensaios por pulsos (0.32 e 0.27 Cmol VFA/Cmol X.h e 0.20 – 0.17 Cmol PHA/Cmol X.h, em A1 e A2, respectivamente), nenhum destes tendo atingido a mesma proximidade com o nível de saturação (uma vez que o teor máximo de PHA foi cerca de 65% em ambos os ensaios A1 e A2).

A estratégia de alimentação em contínuo pareceu ser uma forma eficaz para melhorar a produtividade do processo (Figura 5.1-2). Uma produtividade volumétrica de 1.2 g PHA/L.h foi observada às 6 h no ensaio de alimentação em contínuo (teor de 72%PHA) (Figura 5.1-2-c), o que representa um aumento de 2,5 - 4 vezes relativamente às produtividades obtidas nos ensaios A1 e A2 para os 65% de teor em PHA (0.3 – 0.5 g PHA/L.h) (Figuras 5.1-2 - a, b). De facto, observou-se no ensaio de alimentação em contínuo um decréscimo da

taxa instantânea volumétrica de síntese de PHAs de 1,4 vezes durante as primeiras 6h (Figura 5.1-2-c), valor que é consistente com o factor de diluição (1,4) resultante do novo meio continuamente alimentado ao reactor. Isto é, este decréscimo da velocidade volumétrica deverá estar associado apenas à diluição da biomassa e não à diminuição da velocidade específica. O decréscimo acentuado da velocidade instantânea volumétrica de síntese de PHAs observado cerca das 6h de teste reflecte a diminuição da respectiva velocidade específica associada com a proximidade do nível de saturação.

No ensaio de alimentação em contínuo A3, a produtividade volumétrica e a taxa volumétrica de acumulação instantânea do PHA mantiveram-se superiores ao longo do ensaio em batch e sujeitas a menos flutuações do que as curvas obtidas para os ensaios A1 e A2. Em ambos os ensaios por pulsos (A1 e A2), a taxa volumétrica de acumulação de PHA diminuiu (ou gradualmente (A1) ou de forma mais acentuada (A2) para cada pulso de substrato alimentado e, como consequência, a produtividade volumétrica diminuiu consideravelmente ao longo dos dois ensaios (Figuras 5.1-2-a e 5.1-2-b).

A taxa média específica máxima de velocidade de consumo de substrato e acumulação de PHA observado no ensaio de alimentação em contínuo A3 relativamente aos dos dois ensaios por pulsos (A1 e A2) parecem estar relacionados, por um lado com:

- a) O facto de alguns dos constrangimentos relacionados com a alimentação por pulsos ter sido removido (nomeadamente, as perdas entre os pulsos, perdas de tempo e perdas de polímero).
- b) E mais importante, a concentração máxima de substrato observado ao longo do ensaio em modo descontínuo (nunca abaixo dos 20 Cmmol VFA/L) (Figura 5.1-1-b), que permitiu que as velocidades específicas de consumo de substrato e acumulação de PHA se tenham mantido próximo dos níveis máximos até a saturação.

Pode-se argumentar que durante os ensaios de alimentação por pulsos, o metabolismo de biomassa foi prejudicado metabolicamente durante os períodos de intervalo entre os pulsos.

Se este eventual efeito metabólico adverso foi causado apenas pelas paragens entre os pulsos propriamente ditas ou se está associado com uma eventual desaceleração das taxas metabólicas perto do final de cada pulso (associada à diminuição da concentração residual de substrato), não é totalmente claro a partir dos resultados obtidos.

A principal limitação na produtividade volumétrica imposta pela alimentação em contínuo foi à diluição resultante do novo meio fornecido em contínuo (factor de diluição de 1,4). No entanto, esta pode ser recuperada através do uso de uma alimentação mais concentrada (certificando-se que a concentração residual do substrato é mantida abaixo de valores de inibição) ou acoplando uma membrana de microfiltração no reactor de produção em modo descontínuo. Outra hipótese é fazer a alimentação em contínuo apenas dos VFAs sem a parte hidráulica (o que se poderia fazer usando uma membrana IEMB).

Como se pode ver na Figura 5.1-2-d, que mostra a produtividade volumétrica em função do teor em PHAs, para o mesmo teor em PHAs a produtividade foi maior no ensaio com alimentação em contínuo do que para qualquer dos ensaios de alimentação por pulsos. Foi observada uma diminuição mais gradual da produtividade volumétrica no ensaio de alimentação em contínuo relativamente aos ensaios de alimentação por pulsos.

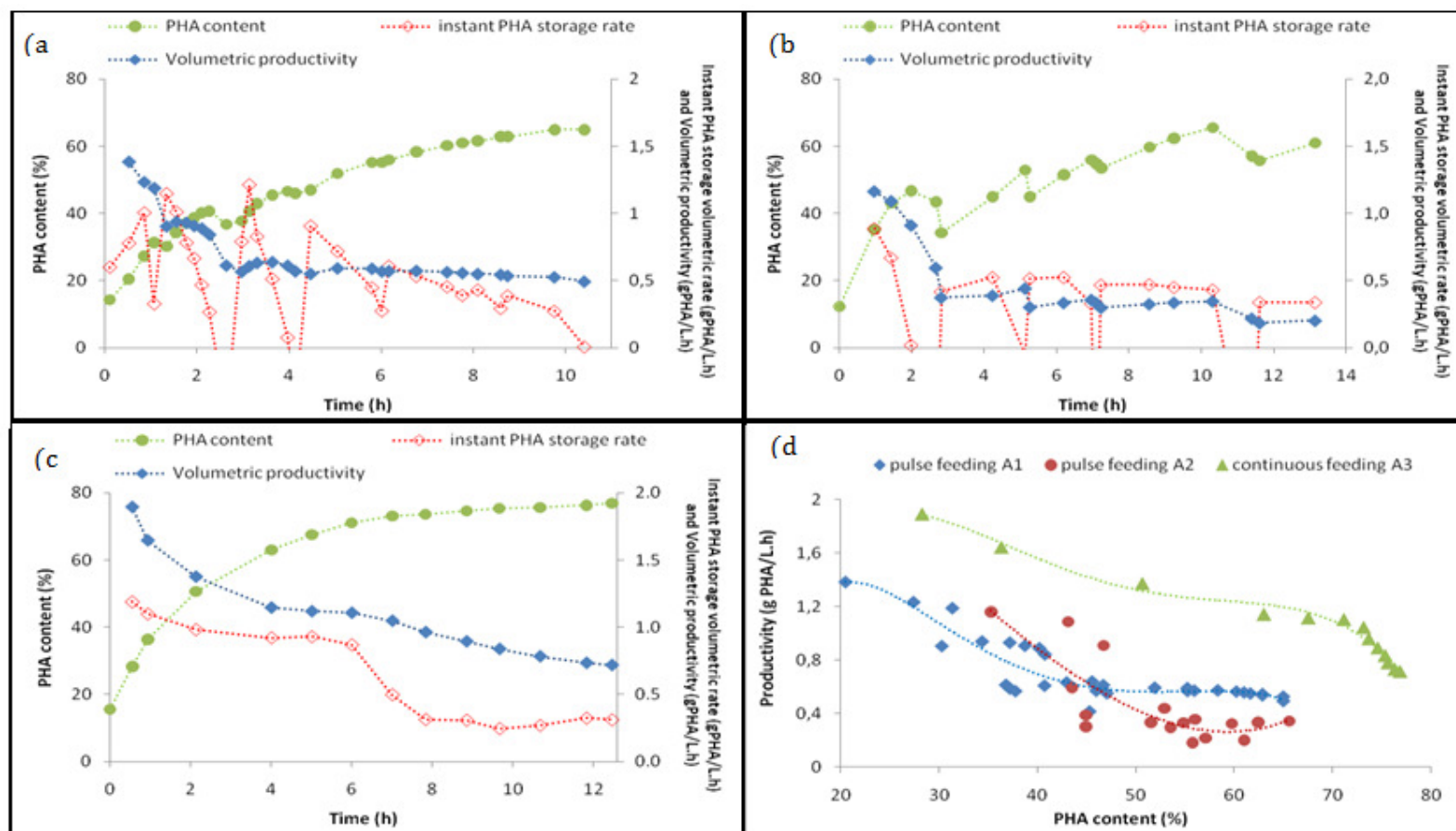


Figura 5.1-2: Produtividade volumétrica de PHA (em g PHA/L h) taxa instantânea de armazenamento de PHA (em g PHA/L.h) e teor em PHA (%) ao longo do tempo para ensaio por pulsos A1 (a) e A2 (b) – respectivamente sem controle de pH – e ensaio de alimentação em contínuo A3 (c); (d) Produtividade de PHA (em g PHA/L h) em função do teor em PHA (%) para ensaios A1, A2 e A3.

5.1.3. Efeito do regime de alimentação na composição do polímero

O efeito no regime de alimentação na composição do polímero também foi avaliado. O uso de alimentação em contínuo resultou num aumento do teor em HV relativamente ao uso de alimentação por pulsos de 31 a 39%. Esta diferença deve-se muito provavelmente ao facto de que nos ensaios de alimentação por pulsos, o propionato e valerato, (cujas fracções são significativamente menores que as fracções de acetato e butirato), são primeiramente esgotados e consequentemente a quantidade de HV formado encontra-se limitada pela disponibilidade desses ácidos (Figura 5.1-1-a, b).

De facto, nos ensaios de alimentação por pulsos A1 e A2, para cada pulso de substrato alimentado, é observado uma síntese de HB em toda a extensão do pulso, enquanto que a síntese de HV termina uma vez esgotados o propionato e valerato.

Pelo contrário, no ensaio de alimentação em contínuo (A3), o fornecimento contínuo de meio fresco, manteve a concentração de acetato e propionato constante (Figura 5.1-1 c), mantendo assim a síntese de HV e HB completos ao longo do ensaio. No ensaio de alimentação em contínuo (A3), a razão HB: HV foi então determinada pela razão de HB e de HV em vez de pela disponibilidade de percursores adequados. Portanto, embora o hidroxibutirato fosse o componente principal do co-polímero produzido, o conteúdo em HV aumentou consideravelmente, como resultado de regime de alimentação por si só.

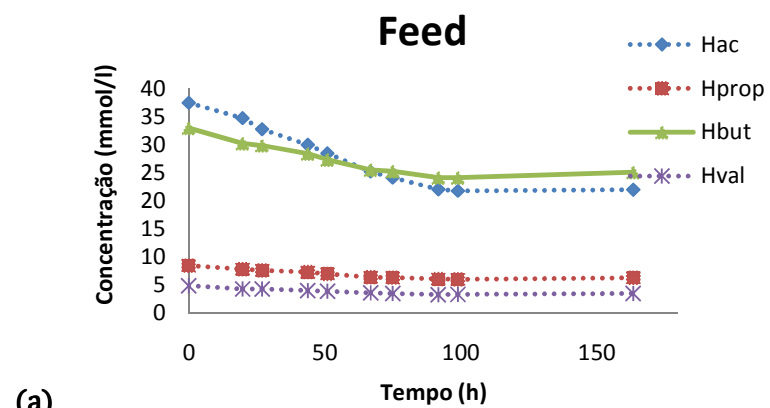
Estes resultados indicam que a estratégia de alimentação em contínuo, além de ser uma alternativa interessante para aumentar a produtividade do processo, também pode ser usada para manipular a composição do polímero, aumentando o leque de composições dos polímeros que podem ser sintetizados a partir de um dado efluente fermentado.

5.2. Estudo do transporte de ácidos carboxílicos de cadeia curta (VFA) por uma membrana de troca iónica

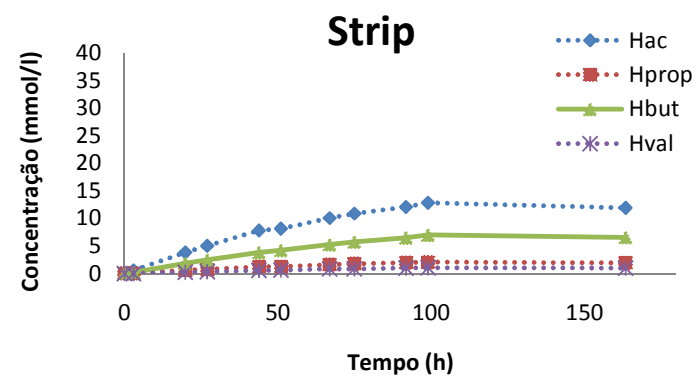
O transporte de ácidos carboxílicos através de uma membrana de troca aniónica depende de vários factores como, propriedades físicas e químicas da membrana, peso molecular, permeabilidade da membrana, concentração do contra-íão cloreto e efeito de iões competidores quando usado uma alimentação de melaço fermentado.

5.2.1. Selecção da membrana

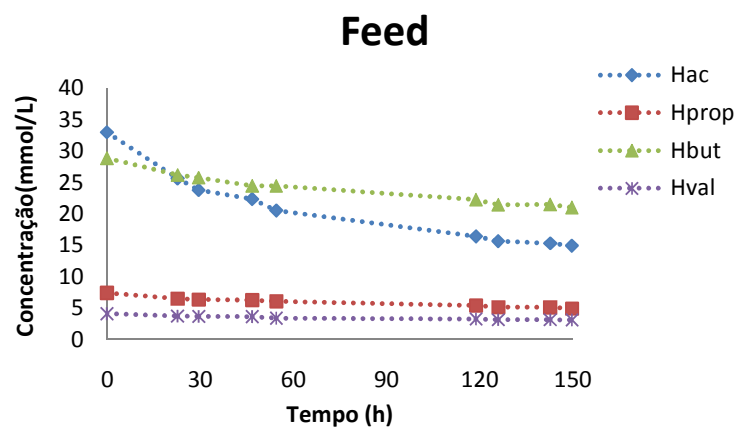
Testaram-se as membranas 100Da (espessura de $107 \pm 12 \mu\text{m}$) e Fumasep FTAM (espessura de $597 \pm 13 \mu\text{m}$) numa célula de difusão, composta por dois compartimentos agitados (designados por “Feed” e “Strip”), de 140 ml cada. A agitação foi de 700 rpm em cada compartimento e a célula foi mantida a temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em “batch” com fermentado de melaço do lado da alimentação com concentração de VFAs de 83,9 mmol/L para o ensaio com membrana Fumasep FTAM e 73,4 mmol/L para o ensaio com membrana 100Da e ambas com concentração do contra-íão de 0,5M do lado do “strip” (Figura 5.2-1).



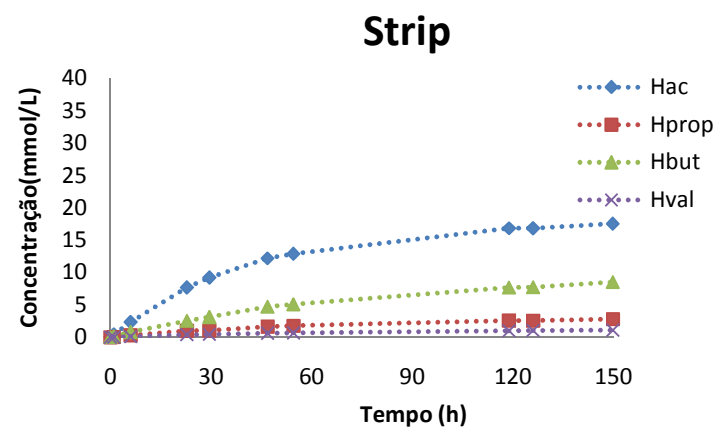
(a)



(b)

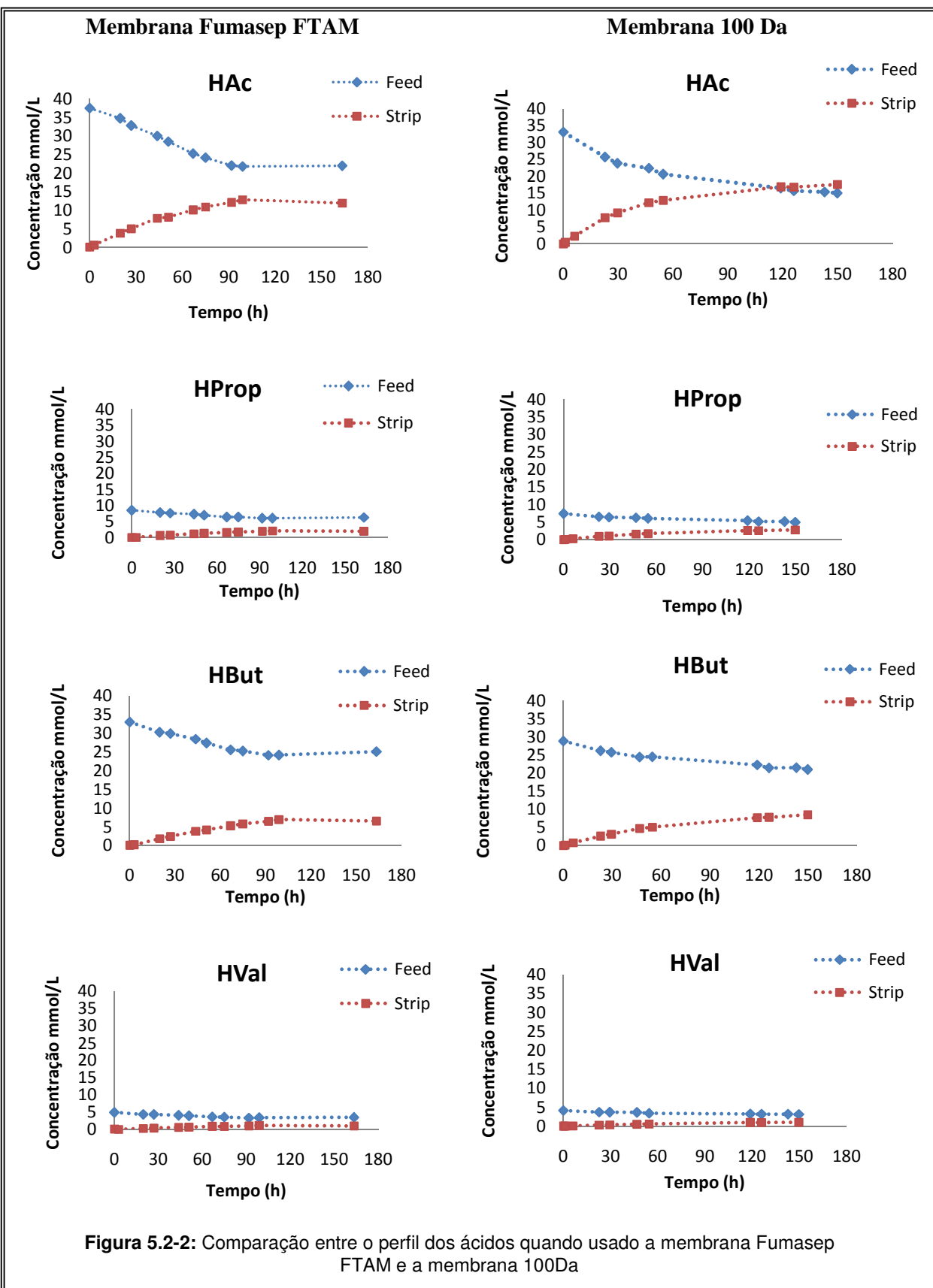


(c)



(d)

Figura 5.2-1: Efeito da membrana no transporte de VFAs (membrana fumasep [(a) e (b)] vs membrana 100Da [(c) e (d)])



A partir das curvas experimentais, foram estimados os fluxos dos 4 ácidos através de cada uma das membranas (Tabela 5.2-1), o transporte é ligeiramente superior para o acetato quando usando a membrana 100 Da em vez da membrana Fumasep FTAM, enquanto que para os outros ácidos os valores são semelhantes, o que seria de esperar uma vez que esta primeira é uma membrana mais aberta. No entanto, observou-se transporte da água por difusão através da membrana 100 Da, o que não permite estimar correctamente os fluxos desta membrana. Também se observou algum transporte de água por osmose através da membrana Fumasep FTAM, mas em menor quantidade. Para ambas as membranas, a ordem de grandeza dos fluxos observados é semelhante às descritas na literatura (A.Zheleznov, D Windmöller, SKörner, K.W.Böddeker).

Tabela 5.2-1: Ensaio de transporte de melaço fermentado contra solução cloreto 0,5 M através de membranas 100Da e Fumasep FTAM

		Feed		Strip	
		[VFAs] ₀ mmol/L	Fluxo (mol/cm ² .s)	Membrana	[Contra-ção] ₀ M
Ensaio 1 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	37,5	6,7 x10 ⁻¹⁰	Fumasep FTAM	NaCl 0,5
	Hprop	8,5	1,1x10 ⁻¹⁰		
	Hbut	33,0	4,1 x10 ⁻¹⁰		
	Hval	4,9	0,89x10 ⁻¹⁰		
	VFAs	83,9	13x10⁻¹⁰		
Ensaio 2 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	33,0	9,1 x10 ⁻¹⁰	100 Da	NaCl 0,5
	Hprop	7,4	1,4 x10 ⁻¹⁰		
	Hbut	28,9	3,7x10 ⁻¹⁰		
	Hval	4,1	0,58 x10 ⁻¹⁰		
	VFAs	73,4	15 x10⁻¹⁰		

A concentração de VFAs do melaço fermentado na alimentação não é exactamente a mesma nos 2 ensaios, 73.4 mmol/L para o ensaio com membrana 100 Da e 83.9 mmol/L para o ensaio com a membrana Fumasep

FTAM. No entanto, o menor fluxo observado para a segunda membrana (Fumasep FTAM) não pode ser em resultado da concentração de ácidos, uma vez que neste ensaio se observou um menor fluxo para uma maior concentração inicial de ácidos carboxílicos (Tabela 5.2-1).

Como se pode verificar a ordem dos fluxos (ordem de passagem dos ácidos carboxílicos através da membrana) - fluxo acetato > fluxo butirato > fluxo propionato > fluxo valerato – é semelhante à ordem das concentrações – concentração de Hac > Hbut > Hprop > Hval, ou seja, o maior ou menor transporte parece estar associado à concentração de cada um dos VFAs mais do que ao respectivo peso molecular. Isto observa-se nas duas membranas. Ou seja, em termos de transporte de VFAs elas comportam-se razoavelmente da mesma forma, a maior diferença parece ser o transporte de água (Figura 5.2-2).

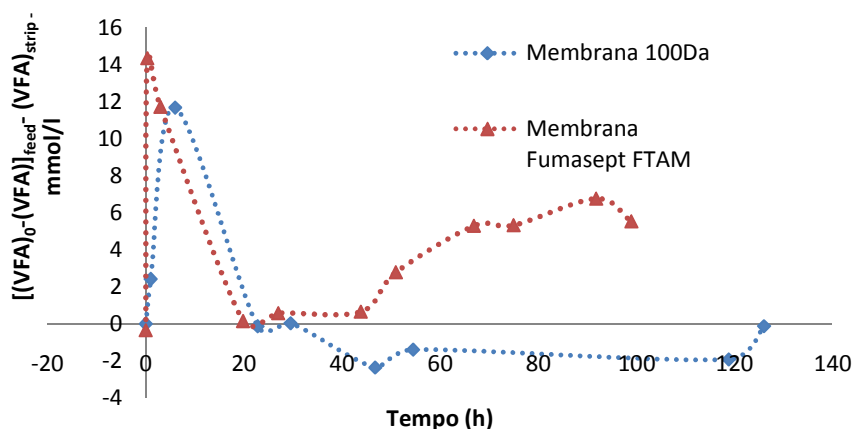


Figura 5.2-3: Diferença entre concentração de Feed e Strip - (Membrana Fumasep FTAM vs Membrana 100Da)

A Figura 5.2-3 mostra que a membrana Fumasep FTAM retém os ácidos por mais tempo, o que faz com que o fluxo inicial diminua.

Apesar dos fluxos maiores obtidos com a membrana 100 Da, decidiu-se que a melhor membrana seria a membrana Fumasep FTAM, uma vez que apresenta menor transporte de água por difusão.

5.2.2. Efeito de “Fouling” no transporte de VFAs

Uma vez que se pretendem usar estas membranas para fazer a adição em contínuo de ácidos carboxílicos a um sistema biológico de produção de PHAs, testou-se o efeito de possível “fouling” oriundo da reutilização da membrana em sucessivos ensaios de produção de PHAs.

Efectuou-se por isso a lavagem da membrana Fumasep FTAM usada no ensaio descrito em 5.2.1 com água e NaCl 0,5 M, a membrana lavada, foi então usada num segundo ensaio de transporte (isto mimetiza a hipótese de se usar a membrana num batch de produção de PHAs, parar, lavar e usar num novo batch). Ensaio descrito na Figura 5.2-4 e valores de fluxos estimados na Tabela 5.2-2.

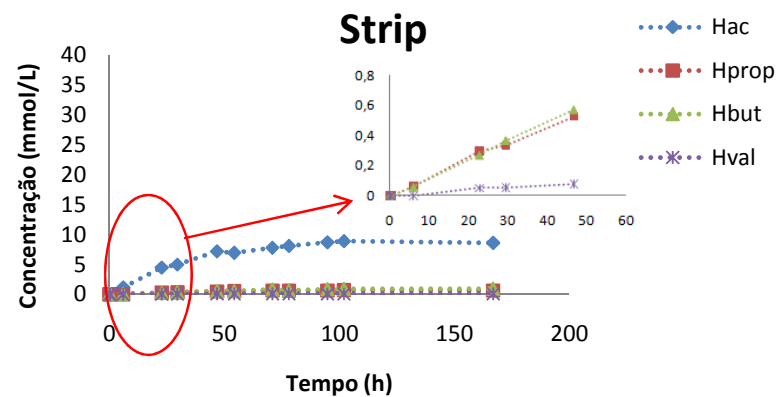
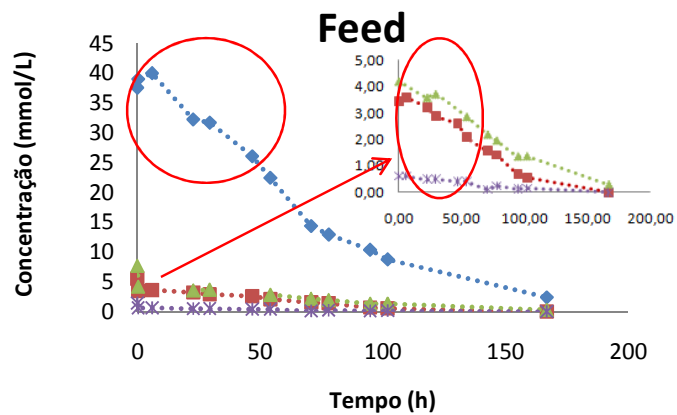
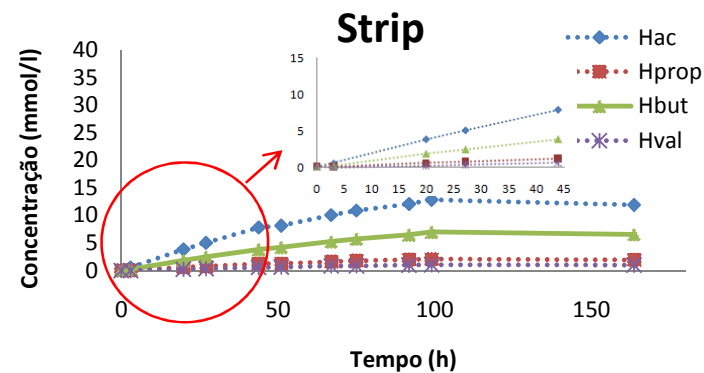
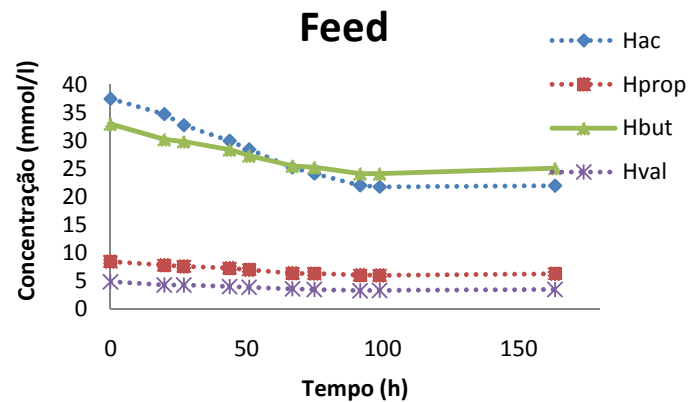


Figura 5.2-4: Efeito de fouling na membrana (Membrana Fumasep FTAM limpa [(a) e (b)] vs membrana Fumasep FTAM usada [(c) e (d)])

Tabela 5.2-2: Efeito de fouling na membrana no transporte de VFAs

		Feed		Membrana	Strip	
		[VFAs] ₀ mmol/L	Fluxo (mol/cm ² .s)		[Contra-íão] ₀ M	Fluxo (mol/cm ² .s)
Ensaio 1 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	37,5	6,7 x10 ⁻¹⁰	Fumasep FTAM	NaCl 0,5	7,0 x10 ⁻¹⁰
	Hprop	8,5	1,1x10 ⁻¹⁰			1,0 x10 ⁻¹⁰
	Hbut	33,0	4,1 x10 ⁻¹⁰			3,3 x10 ⁻¹⁰
	Hval	4,9	0,89x10 ⁻¹⁰			0,53 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	83,9	13x10⁻¹⁰			12x10⁻¹⁰
Ensaio 3 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	37,6	11,7 x10 ⁻¹⁰	Fumasep FTAM (usada)	NaCl 0,5	5,4 x10 ⁻¹⁰
	Hprop	5,5	0,82 x10 ⁻¹⁰			0,44 x10 ⁻¹⁰
	Hbut	7,7	0,94 x10 ⁻¹⁰			0,48 x10 ⁻¹⁰
	Hval	1,4	0,16 x10 ⁻¹⁰			0,07 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	52,3	14x10⁻¹⁰			6,4x10⁻¹⁰

Do lado do “strip” os fluxos baixam bastante do ensaio 1 para o ensaio 3 → o que sugere possível “fouling”. No entanto, é preciso notar que os dois ensaios não foram efectuados com a mesma concentração de VFAs, o que pode explicar em parte, os menores fluxos obtidos, para o butirato e valerato. Para o acetato, no entanto, a concentração é semelhante e o fluxo menor, o que sugere “fouling” da membrana.

Por outro lado, é de notar que no ensaio 3, o decréscimo da concentração de ácidos do lado da alimentação é muito superior do lado do “feed” do que o aumento respectivo do lado do “strip”. A discrepância é tão grande (Tabela 5.2-3) que parece evidenciar um consumo biológico, em resultado da contaminação mais do que acumulação na membrana.

Tabela 5.2-3: Declive de concentrações dos ácidos carboxílicos do ensaio 3

	Declive	
	Feed	Strip
Acetato	0,3	0,14
Propionato	0,021	0,011
Butirato	0,024	0,012
Valerato	0,004	0,001

O decréscimo da concentração de VFAs observado na Figura 5.2.5 trata-se certamente de um consumo biológico uma vez que ao longo da experiência também se verificou um rápido crescimento de um biofilme à superfície da membrana no lado do “feed”.

Este crescimento de biofilme ao longo da experiência pode dever-se ao facto de ter ficado uma quantidade residual de melaço fermentado retido na membrana.

A Figura 5.2-5 mostra claramente que não há transporte, nesse caso não se trata de retenção de ácidos na membrana, mas sim consumo.

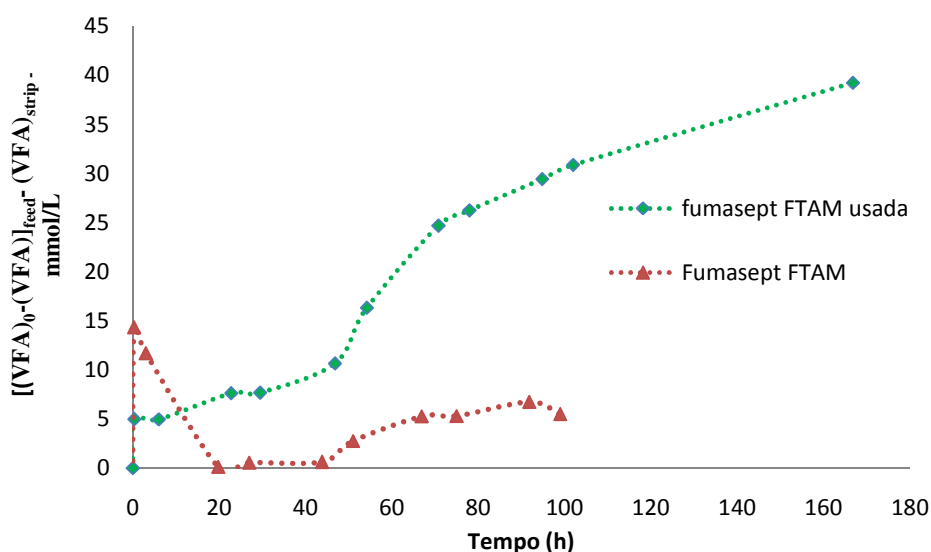


Figura 5.2-5: Diferença entre concentração de “Feed” e “Strip” (Membrana Fumasept FTAM vs Membrana Fumasept FTAM usada pela segunda vez)

5.2.3. Determinação da permeabilidade da membrana seleccionada para os diferentes ácidos

O objectivo desta etapa foi determinar a permeabilidade da membrana seleccionada para os diferentes ácidos.

Uma vez que o fermentado de melaço contem os diferentes ácidos em diferentes concentrações, decidi fazer-se um ensaio com concentração equimolar para aferir o transporte independentemente da concentração. A permeabilidade vai depender de características de cada ácido, como o peso molecular e a sua hidrofobicidade. Este ensaio foi desenhado para concentrações iguais dos 4 ácidos (0,1M) e contra o contra-íão (NaCl 1M) (Figura 5.2-6 e 5.2-7).

No entanto, houve um erro na preparação da solução e por isso o ensaio na prática acabou por ser realizado em condições semelhantes às do melaço fermentado, isto é concentração de ácido acético muito superior à dos restantes ácidos.

Os ácidos estão ordenados em relação ao peso molecular (g/mol) na seguinte sequência: MM_{HAc} (60) << MM_{HProp} (74) << MM_{Hbut} (88) << MM_{Hval} (102).

Outro aspecto importante é a hidrofobicidade do ácido perante a membrana. Existe uma relação entre o peso molecular e a hidrofobicidade de uma substância. Moléculas com alto peso molecular tendem a apresentar menor solubilidade em água. Portanto, a sua hidrofobicidade é relativamente elevada.

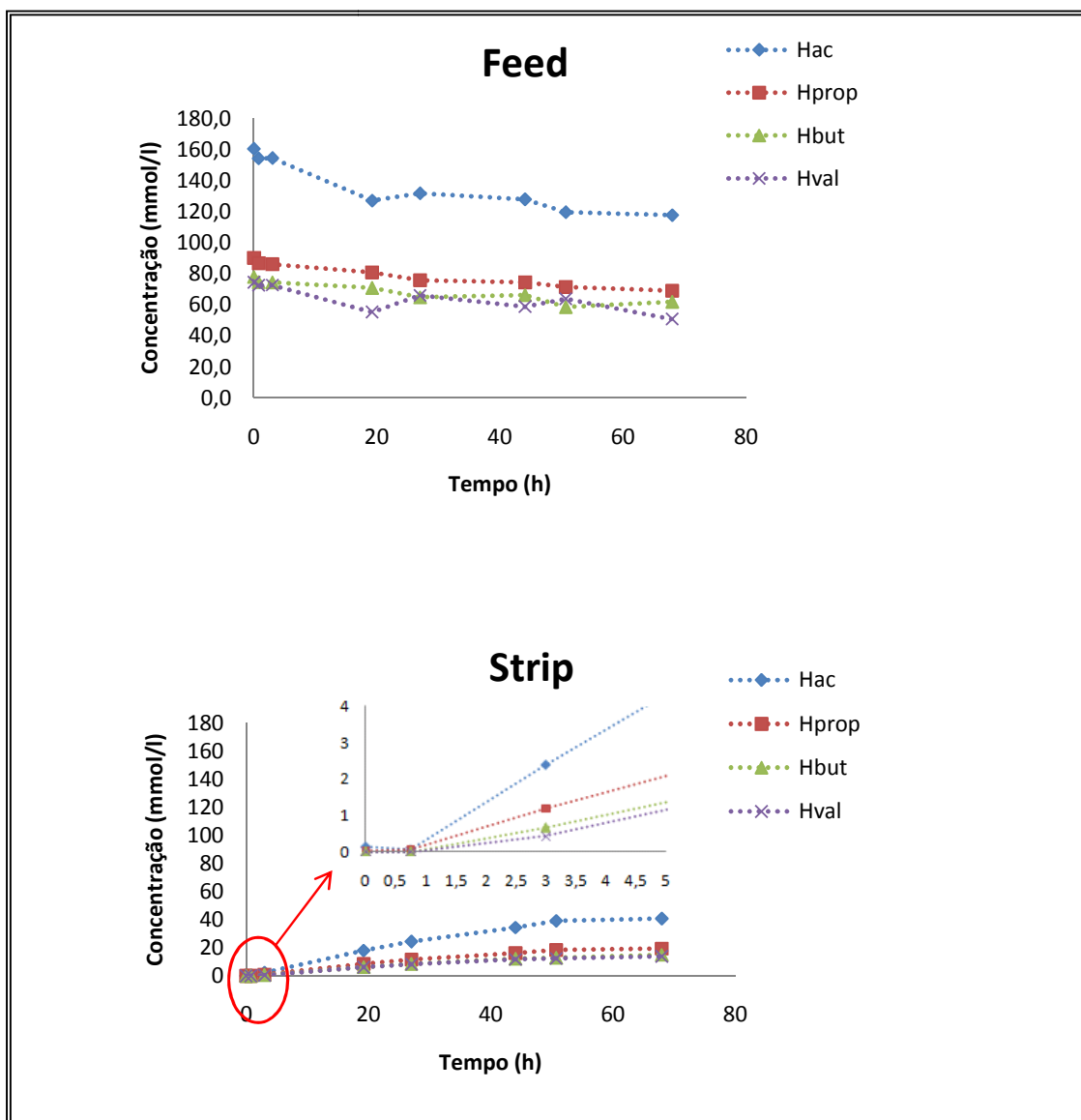


Figura 5.2-6: Ensaio com mistura sintética de VFAs

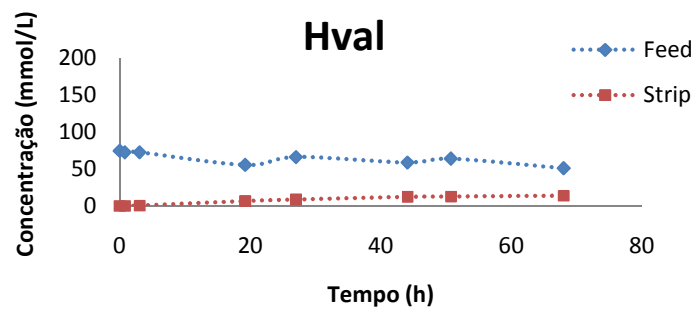
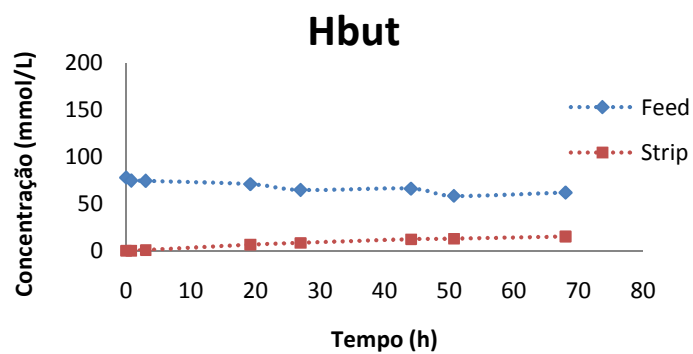
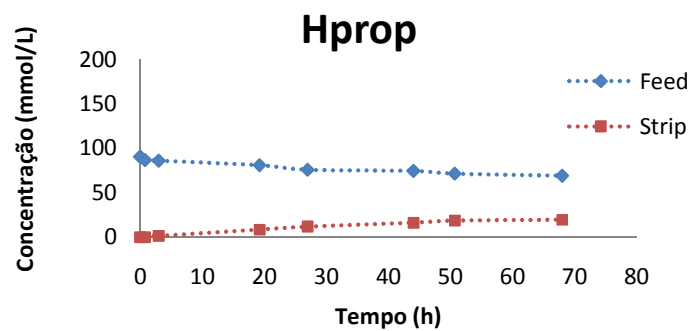
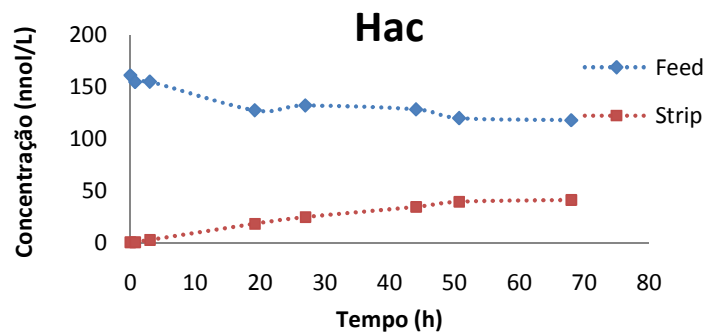


Figura 5.2-7: Ensaio da mistura sintética de VFAs para cada ácido

Tabela 5.2-4: Determinação da permeabilidade para os diferentes ácidos (Remover o efeito da concentração de ácido a transportar)

		Feed				Strip	
		[VFAs] ₀ mmol/L		Fluxo (mmol/cm.s)	Membrana	[Contra-íão] ₀ M	Fluxo (mmol/cm ² .s)
Ensaio 7 (mistura sintética de VFAs)	HAc	160,5	402,9	6,0 x10 ⁻⁶	Fumasep FTAM	NaCl 1M	3,7 x10 ⁻⁶
	HProp	90,2		4,5 x10 ⁻⁶			1,7 x10 ⁻⁶
	HBut	77,9		4 x10 ⁻⁶			1,26 x10 ⁻⁶
	HVal	74,6		1,8 x10 ⁻⁶			1,3 x10 ⁻⁶

Observa-se pela Tabela 5.2-4 que quanto maior a concentração do ácido maior é o fluxo, pois essa mistura sintética de VFAs mostrou que o facto do acetato em relação aos outros ácidos estar presente no melaço fermentado em maior concentração faz com que este tenha um fluxo maior.

Para não induzir em erro, compararam-se apenas os fluxos do lado do “feed”.

No entanto, a permeabilidade dos ácidos na membrana Fumasep FTAM (Tabela 5.2-5) é maior para o ácido propiónico seguido do ácido butírico, ácido acético e por último o ácido valérico (tanto para Diálise de Donnan como também usando difusão simples).

Tabela 5.2-5: Valores de permeabilidade para cada ácido

	Acetato	Propionato	Butirato	Valerato
pKa	4,75	4,87	4,88	4,82
Ka	$1,7 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-5}$
Ião dissociado mmol/cm³	$2,68 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-3}$
C _{ião} /C _{contra-ião}	$2,68 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-3}$
Ião não dissociado mmol/cm ³	$1,58 \times 10^1$	$8,9 \times 10^{-2}$	$7,68 \times 10^{-2}$	$7,43 \times 10^{-2}$
J mmol/cm².s	6×10^{-6}	$4,5 \times 10^{-6}$	4×10^{-6}	$1,8 \times 10^{-6}$
Pm (Diálise de Donnan) cm²/s	$6,65 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-4}$	$4,75 \times 10^{-5}$
Pm (Difusão simples) cm²/s	$2,26 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-6}$	$2,79 \times 10^{-6}$	$1,44 \times 10^{-6}$

Uma vez que os 4 ácidos são ácidos fracos, a pH 6, encontravam-se maioritariamente na forma não-dissociada (13 – 17% de ácido dissociado), o que causou uma limitação à diálise de Donnan. Isto significa, que se operarmos a pH mais baixo poderíamos eventualmente obter maiores fluxos.

Apesar desta limitação, a diálise de Donnan é sempre um maior componente do transporte comparado com a difusão simples.

Em relação ao transporte por difusão simples, a permeabilidade é semelhante para os 3 ácidos mais pequenos (acético, propiónico e butírico) e só decresce significativamente para o valerato, que é o ácido com maior peso molecular, enquanto que em relação à permeabilidade por diálise de Donnan, é importante distinguir 2 factores que influenciam a permeabilidade: a difusividade (que é influenciada pelo tamanho da molécula) e a solubilidade da molécula na membrana (que pode depender da hidrofobicidade ou seja quanto maior a hidrofobicidade, menor é a solubilidade e maior o peso molecular).

Podemos especular que a componente difusividade vai ser tanto maior quanto menor o tamanho, enquanto a componente solubilidade vai ser tanto maior quanto mais hidrofóbica for a molécula. Assim, o primeiro componente (difusividade) vai diminuir com o tamanho da molécula, enquanto o segundo

(solubilidade) vai aumentar com o tamanho da molécula. A permeabilidade resultante destes 2 componentes vai ser um equilíbrio entre estes dois efeitos (Figura 5.2-8) e será por isso que a permeabilidade é maior para o propionato, seguido do butirato, acetato e por último para o valerato.

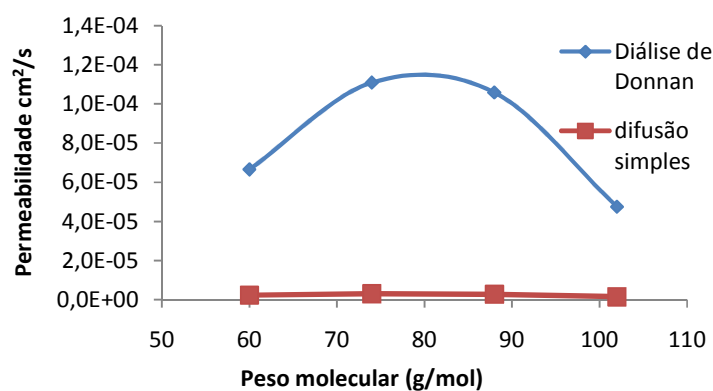


Figura 5.2-8: Permeabilidade dos diferentes ácidos por diálise de Donnan e difusão simples

5.2.4. Efeito da concentração de NaCl no transporte de VFAs

De modo a minimizar o transporte de água por osmose usaram-se 2 concentrações de contra-íão cloreto 0,1M e 0,5M do lado do “strip” e melaço fermentado no lado do “feed” em concentrações diferentes (83,9 e 61,3 mmol/L respectivamente) e a mesma membrana Fumasep FTAM (Figura 5.2-9).

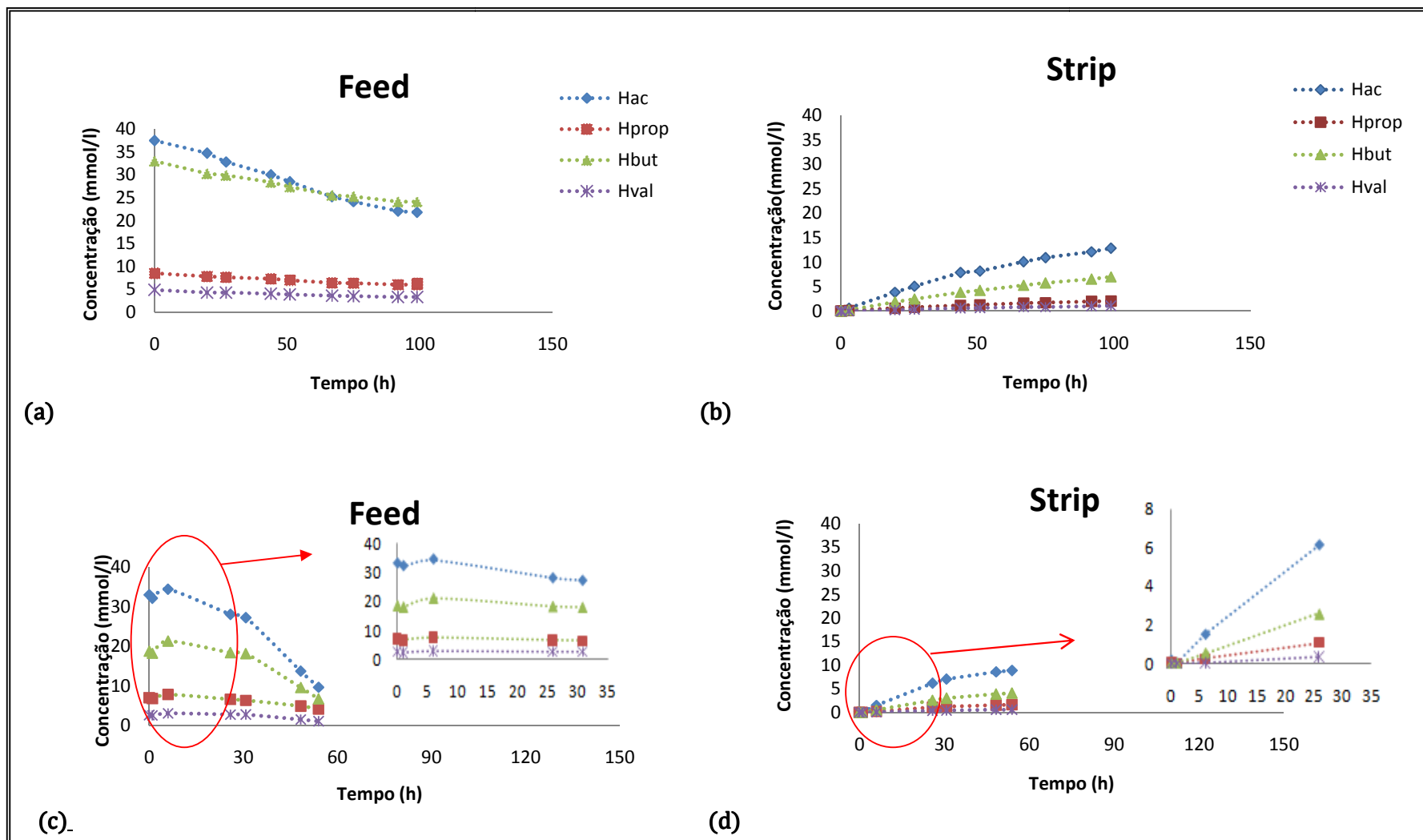


Figura 5.2-9: Efeito da concentração de NaCl 0,5M [(a) e (b)]vs NaCl 0,1M [(c) e (d)] (Membrana Fumasep FTAM)

Tabela 5.2-6: Efeito da concentração de NaCl (0,5M vs 0,1M)

		Feed		Strip		
		[VFAs] ₀ mmol/L	Fluxo (mol/cm ² .s)	Membrana	[Contra-ção] ₀ M	Fluxo (mol/cm ² .s)
Ensaio 1 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	37,5	6,7 x10 ⁻¹⁰	Fumasep FTAM	NaCl 0,5	7,0 x10 ⁻¹⁰
	Hprop	8,5	1,1x10 ⁻¹⁰			1,0 x10 ⁻¹⁰
	Hbut	33,0	4,1 x10 ⁻¹⁰			3,3 x10 ⁻¹⁰
	Hval	4,9	0,89x10 ⁻¹⁰			0,53 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	83,9	13x10 ⁻¹⁰			12x10 ⁻¹⁰
Ensaio 4 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Hac	33,0	7,7 x10 ⁻¹⁰	Fumasep FTAM	NaCl 0,1	9,3 x10 ⁻¹⁰
	Hprop	7,0	0,8x10 ⁻¹⁰			1,6 x10 ⁻¹⁰
	Hbut	18,7	5,2 x10 ⁻¹⁰			3,9 x10 ⁻¹⁰
	Hval	2,6	0,12 x10 ⁻¹⁰			0,54 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	61,3	14x10 ⁻¹⁰			15x10 ⁻¹⁰

Como se pode observar na Figura 5.2-9 no ensaio efectuado com a solução de contra-ção 0,1M, a curva de concentração de ácidos do lado do “feed”, tem um declive acentuado a partir das 30 h de ensaio, parecendo indicar um consumo biológico (por parte de um biofilme que se formou à superfície da membrana do lado do “feed” durante a experiência) e não resultado do transporte dos ácidos, o que torna o resultado pouco fiável. O ajuste que permitiu determinar os fluxos quer do lado do “feed” quer do lado do “strip” foi determinado com os pontos anteriores a esta variação. Para não induzir em erro, fomos comparar 0,1M com 0,5M apenas dos fluxos do lado do “strip”. Ainda assim se observam fluxos maiores para 0,1M do que 0,5M, o que seria contrário ao que se esperaria.

Para o ensaio em que a concentração de NaCl é de 0,1M o fluxo é maior do que o ensaio quando usado uma concentração de NaCl de 0,5 M (Tabela 5.2-6) o que não era de esperar, no entanto isto porque a concentrações maiores de NaCl maior é o transporte da água por osmose o que torna o fluxo dos ácidos mais lentos para concentrações de NaCl mais elevadas.

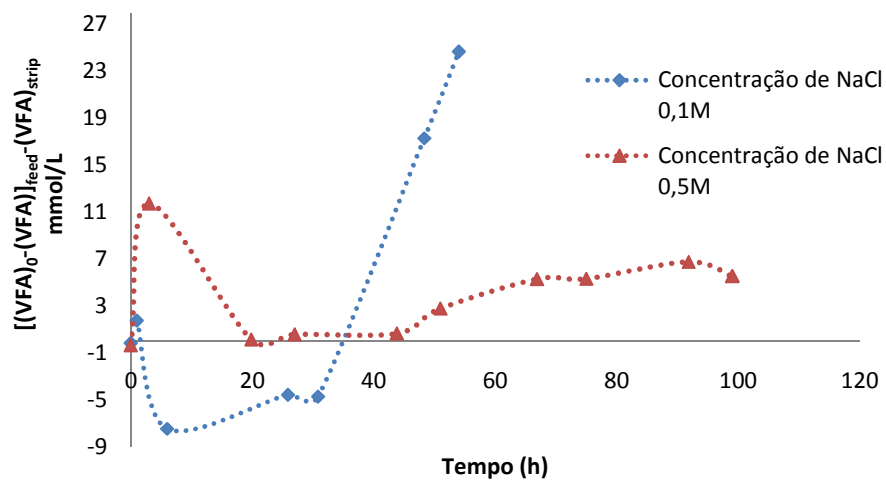


Figura 5.2-10: Diferença entre concentração do Feed e Strip (Efeito da concentração de NaCl 0,1M vs 0,5M)

O decréscimo da concentração de VFAs a partir de certa altura observado na Figura 5.2.10 trata-se certamente de um consumo biológico.

5.2.5. Efeito dos íões competidores do melaço fermentado

Uma vez que no melaço fermentado encontram-se presentes também aniões inorgânicos, estes podem competir de certa forma com os VFAs dificultando o transporte destes. De modo a impedir o transporte dos aniões inorgânicos a mesma concentração de aniões presentes no melaço fermentado foi adicionada no lado do “strip”.

Analizou-se uma amostra de melaço fermentado de forma a fermentar a quantificar os aniões inorgânicos presentes. Verificou-se que o anião predominante é o Cl^- , tendo-se ainda encontrado nitrato, fosfato e sulfato presentes em quantidades menores (Tabela 5.2-7).

Tabela 5.2-7: Concentração de aniões inorgânicos no melaço fermentado (mmol/L)

Aniões	Concentração mmol/L
Cloretos	$40,3 \pm 0,98$
Nitratos	$0,01 \pm 0,009$
Fosfatos	$1,01 \pm 0,009$
Sulfatos	$0,82 \pm 0,009$

De forma a aferir o efeito no transporte de VFAs da presença de íões inorgânicos competidores, os ensaio 4 e 5, foram efectuados com, o mesmo melaço fermentado do lado do “feed” e a mesma concentração de NaCl do lado do “strip”. Adicionou-se, no entanto, ao lado do “strip” do ensaio 5 nitrato, fosfato e sulfato em concentrações semelhantes às medidas no melaço fermentado de forma a inibir o eventual transporte de aniões inorgânicos do melaço fermentado. Estes ensaios estão apresentados na Figura 5.2-11 e os fluxos na Tabela 5.2-8.

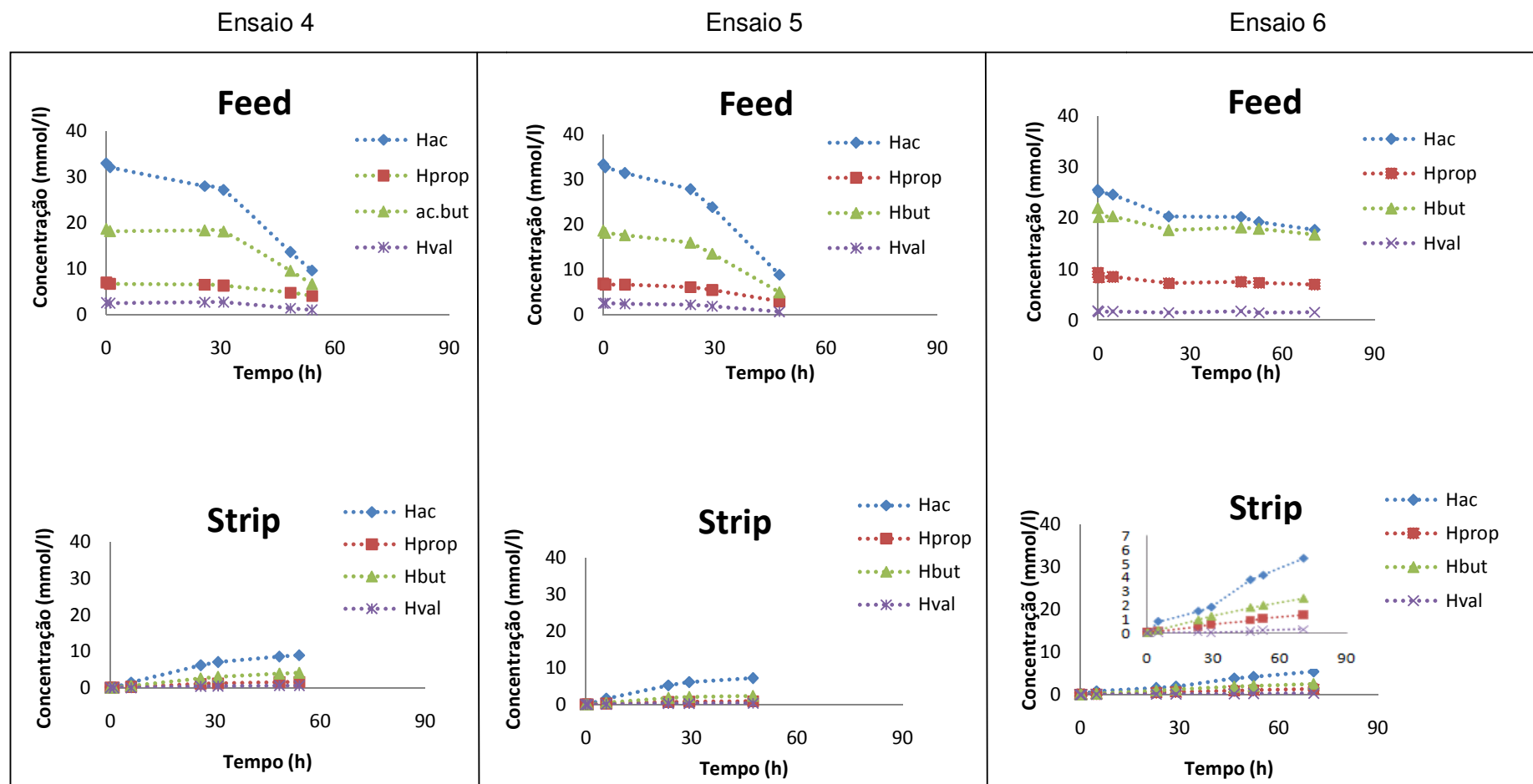


Figura 5.2-11: Efeito dos iões competidores presentes no melão fermentado no transporte de VFAs

Tabela 5.2-8: Resumo dos ensaios para testar o efeito dos iões competidores no transporte de VFAs

			Feed			Strip			
			[VFAs] ₀ /[aniões] mmol/L		Fluxo mol/cm ² .s)	Membrana	[Contra-ião] ₀ M	[aniões] ₀ mmol /L	Fluxo mol/cm ² .s)
Ensaio 4 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Aniões inorgânicos	Cl ⁻	40,3	42,1	nd	Membrana Fumasep FTAM	NaCl 0,1 M	0	nd
		NO ₃ ⁻	0,01		nd			0	nd
		PO ₄ ⁻	1,01		nd			0	nd
		SO ₄ ⁻	0,82		nd			0	nd
	VFAs	Hac	33,0	61,3	7,7 x10 ⁻¹⁰			-	9,0 x10 ⁻¹⁰
		Hprop	7,0		0,8x10 ⁻¹⁰				1,6 x10 ⁻¹⁰
		Hbut	18,7		5,2 x10 ⁻¹⁰				3,9 x10 ⁻¹⁰
		Hval	2,6		0,12 x10 ⁻¹⁰				0,54 x10 ⁻¹⁰
Ensaio 5 (<i>Melaço Fermentado</i>)	Aniões inorgânicos	Cl ⁻	27,87	30,0	23 x10 ⁻¹⁰		NaCl 0,1 M	148,3*	7,4 x10 ⁻¹⁰
		NO ₃ ⁻	0,12		0,1 x10 ⁻¹⁰			0,3	0,4 x10 ⁻¹⁰
		PO ₄ ⁻	0,83		0,4 x10 ⁻¹⁰			0,2	0,3 x10 ⁻¹⁰
		SO ₄ ⁻	1,20		1,2 x10 ⁻¹⁰			2,6	0,4 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	Hac	33,4	61,6	8,6 x10 ⁻¹⁰			-	8,7x10 ⁻¹⁰
		Hprop	6,9		1,1 x10 ⁻¹⁰				1,0x10 ⁻¹⁰
		Hbut	18,7		4,0 x10 ⁻¹⁰				3,0 x10 ⁻¹⁰
		Hval	2,6		0,5 x10 ⁻¹⁰				0,40 x10 ⁻¹⁰
Ensaio 6 (<i>Meio sintético</i>)	Aniões inorgânicos	Cl ⁻	78,6	81,4	22,5x10 ⁻¹⁰		NaCl 0,1 M	307,4**	4,88 x10 ⁻¹⁰
		NO ₃ ⁻	0,1		0			0	0
		PO ₄ ⁻	0,4		1,1x10 ⁻¹⁰			0,4	0,79 x10 ⁻¹⁰
		SO ₄ ⁻²	2,3		10,2 x10 ⁻¹⁰			2,2	7,3 x10 ⁻¹⁰
	VFAs	Hac	27,1	51,7	9,2 x10 ⁻¹⁰			-	2,4 x10 ⁻¹⁰
		Hprop	7,0		2,0 x10 ⁻¹⁰				0,72 x10 ⁻¹⁰
		Hbut	15,8		4,2 x10 ⁻¹⁰				1,6 x10 ⁻¹⁰
		Hval	1,7		0,42 x10 ⁻¹⁰				0,12 x10 ⁻¹⁰

* valor da concentração de NaCl 0,1 M adicionado a quantidade de NaCl presente no melaço (40mmol/l = 0,04M))

** valor da concentração de NaCl 0,3 M adicionado a quantidade de NaCl presente no melaço (78,6mmol/l = 0,0786M))

No caso em que o transporte de iões inorgânicos do melaço fermentado estivesse a limitar consideravelmente o transporte de VFAs no ensaio 4 deveria observar-se um aumento considerável dos fluxos no ensaio 5, relativamente ao ensaio 4. No entanto, não só não se observou um aumento dos fluxos, como estes até sofreram uma pequena diminuição. No entanto é preciso referir que a concentração de iões competidores no melaço fermentado do ensaio 5 não era semelhante à concentração de iões determinada na caracterização prévia do melaço fermentado, o que fez com que a diferença de concentrações entre “feed” e o “strip” no ensaio 5 não fosse nula, tal como se pretendia. Ou seja, ao contrário do que se pretendia, não foi de facto possível neutralizar o transporte destes iões, tanto do “feed” para o “strip” (NO_3^- , SO_4^-), como do “strip” para o “feed” (PO_4^-) (Figura 5.2-12).

Para ambos os ensaios (ensaio 4 e 5) verificou-se um consumo dos ácidos durante a experiência na mesma altura, isso porque já existia um biofilme residual no melaço que foi desenvolvendo ao longo da experiência quando em contacto com a temperatura ambiente.

Para não haver a possibilidade de haver crescimento de biomassa, optou-se por fazer um ensaio com um meio sintético (ensaio 6) com a mesma composição quer de VFAs quer de iões competidores presente no melaço fermentado usado nos ensaios 4 e 5 do lado do “feed” e do lado do “strip” NaCl 0,1M mais os iões competidores.

No entanto, devido a um erro de medição a concentração de NaCl foi de 0,3M, o que torna impossível a comparação entre os ensaios com melaço fermentado. Neste ensaio apesar da concentração de NaCl ser mais elevada do que a concentração de VFAs também é menor do que nos outros ensaios (ensaios 4 e 5). No entanto, o fluxo do lado do “feed” não apresenta valores muito diferentes dos ensaios anteriores, mas em relação ao “strip” o fluxo dos ácidos já é bastante diferente, isto porque ao pH a que este ensaio foi realizado (pH 4), ainda os ácidos não estão completamente dissociados, o que torna o fluxo mais lento (Tabela 5.2-8).

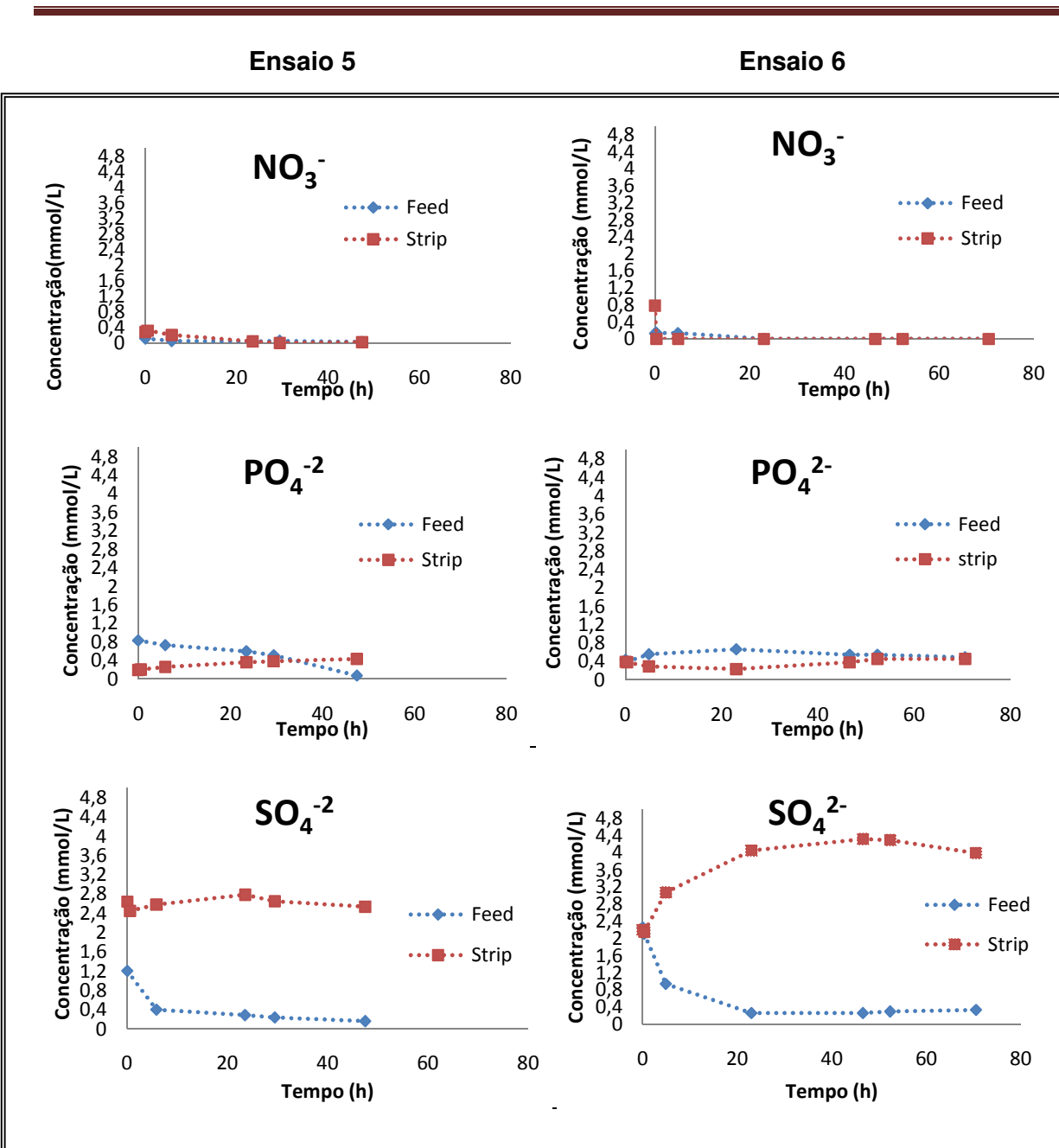


Figura 5.2-12: Efeito dos íons competidores

Tendo em conta os ensaios 5 e 6 (Figura 5.2-12) em que se usou íões competidores presentes no melaço em ambos as compartimentos (“Feed” e “Strip”), na tentativa de anular o transporte dos íões, verificou-se que para o ensaio 5 o PO_4^{2-} diminui do lado do “feed” (mais concentrado) e aumenta do lado do “strip” (menos concentrado). No entanto para o ensaio 6, em que as concentrações de PO_4^{2-} são iguais em ambos os lados, nota-se que atingindo um certo tempo os dois lados atingem um equilíbrio. Para o

SO_4^{2-} , ao contrário do PO_4^{2-} , no ensaio 5 o “strip” (mais concentrado) aumenta enquanto que o “feed” (menos concentrado) diminui, enquanto que para o ensaio 6 apesar do SO_4^{2-} se encontrar presente em ambos os compartimentos com concentração aproximadamente igual, não foi possível neutralizar o transporte deste.

5.3. Composição do polímero

A possibilidade de manipular a composição do polímero é de elevada importância no processo de produção do PHA.

Como o acetato e butirato são os mais concentrados, vão ter os fluxos maiores, logo o polímero será mais rico em HB no início; a partir de certa altura o acetato e butirato decrescem no “feed”. Assim, será de esperar ter polímeros com duas regiões muito diferentes, região 1 homopolímero e região 2 co-polímero com fracção HV menor (block co-polymers).

Como exemplo do ensaio 4 com melaço fermentado (Feed) + NaCl 0,1M (Strip).

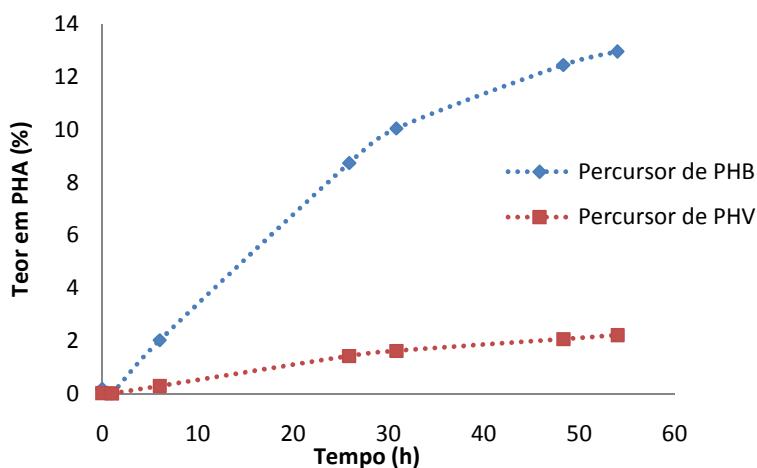


Figura 5.3-1: Composição do polímero

* percursor de PHB (Hac + Hbut)

* Percursor de PHV (Hprop + Hval)

6. Conclusão

- **Produção de PHAs**

Do estudo de estratégias para melhorar a fase de acumulação de PHAs, em termos de produtividade e possibilidade de manipular a composição do polímero num processo de três etapas de produção de PHAs a partir de melaço de cana-de-açúcar, verificou-se que o uso da estratégia de alimentação em contínuo em vez da estratégia de alimentação por pulsos, pode não só ajudar a diminuir as restrições da estratégia de alimentação por pulsos (muitas vezes, pára entre os pulsos com o consumo do polímero), como também permitir que as taxas mais elevadas de substrato e armazenamento de polímero sejam mantidas devido à concentração constante residual do substrato.

Além disso, o uso de alimentação contínua aumentou o teor em HV de 8-11% relativamente ao obtido a partir da mesma matéria-prima com alimentação por pulsos. Isso pode ser uma alternativa interessante para manipular a composição do polímero, aumentando o intervalo de composições de polímero que pode ser sintetizada a partir de um determinado efluente fermentado.

O intervalo da composição de PHA obtido (PHB - co- HV) com intervalos de HV variando entre 15 a 39 % (determinado por NMR), resultante de diferentes perfis de VFAs e regimes de alimentação diferentes, posteriormente resultaram em polímeros com diferentes propriedades.

Os polímeros produzidos apresentam peso molecular ligeiramente menor do que aqueles geralmente produzidos com culturas mistas em condições aeróbias, mas ainda significativamente alto para processamento com o termoplástico.

- **Transporte dos ácidos carboxílicos voláteis (VFAs)**

No estudo do transporte o passo mais importante é a escolha de uma membrana adequada, capaz de transportar apenas os ácidos em questão a um determinado fluxo, pois apesar das moléculas de água serem polares, o seu pequeno tamanho (0,3 nm de diâmetro), permite-lhes uma rápida difusão através das membranas. Sendo assim, verificou-se que para o ensaio em que se usou a membrana fumasep FTAM em vez da membrana 100Da, apesar de ter menor fluxo apresentava menor transporte de água por osmose.

A presença de “fouling” na membrana fez com que os fluxos diminuíssem e que houvesse crescimento de biomassa o que fez com que houvesse consumo em vez de haver transporte.

O cálculo da permeabilidade, usando uma mistura sintética de VFAs mostrou que, o facto do acetato estar presente no melaço fermentado em maior concentração faz com que este tenha um fluxo maior.

Os 4 ácidos, encontravam-se maioritariamente na forma não-dissociada (13 – 17% de ácido dissociado), o que causou uma limitação à diálise de Donnan. Isto significa, que se operarmos a pH mais baixo poderíamos eventualmente obter maiores fluxos.

Para o transporte por difusão simples, a permeabilidade é semelhante para os 3 ácidos mais pequenos (acético, propiónico e butírico) e só decresce significativamente para o valerato, que é o ácido com o maior peso molecular, enquanto que em relação à permeabilidade por diálise de Donnan, é importante distinguir 2 factores que influenciam a permeabilidade: a difusividade e a solubilidade.

Podemos especular que a componente difusividade vai ser tanto maior quanto menor o tamanho, enquanto a componente solubilidade vai ser tanto maior quanto mais hidrofóbica for a molécula.

Interessa também saber a concentração ideal de contra-ião cloreto para que não haja transporte por osmose. Sendo assim, foram comparadas duas

concentrações diferentes de contra-íão 0,5M e 0,1M com concentrações de VFAs diferentes. No entanto, obteve-se fluxos maiores para o ensaio com contra-íão de 0,1M maior do que o de 0,5M, o que não era de esperar. Tal facto poderá dever-se ao elevado transporte de água por osmose no ensaio com 0,5M dificultando assim o transporte dos ácidos.

Uma vez que no melaço fermentado existem iões que podem competir com os VFAs no transporte, fez-se estudos com melaço fermentado e mistura de VFAs sintéticos com a mesma composição de aniões inorgânicos em ambos os compartimentos (“Feed” e “Strip”). Para o ensaio 5, o PO_4^{2-} diminui do lado do “feed” (mais concentrado) e aumenta do lado do “strip” (menos concentrado), enquanto que no ensaio 6, em que as concentrações de PO_4^{2-} são iguais em ambos os lados, nota-se que atingindo um certo tempo os dois lados atingem um equilíbrio. Para o SO_4^{2-} ao contrário do PO_4^{2-} no ensaio 5 o “strip” (mais concentrado) aumenta enquanto que o “feed” (menos concentrado) diminui e para o ensaio 6, apesar do SO_4^{2-} se encontrar presente em ambos os compartimentos com concentração aproximadamente igual, não foi possível neutralizar o transporte destes iões.

7. Bibliografia

- Albuquerque MGE, Eiroa M, Torres C, Nunes BR, Reis MAM (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. J Biotechnol 130: 411-421.
- A zheleznov, D Windmöler, S.Körner, K.W. Böddeker*, Dialytic transport of carboxylic acids through an anion exchange membrane.
- Biby,G.D., 2002. Degradable plastics: <http://www.icma.com/inf/polymers.htm>
- Crank, M. and Patel, M. (2005) *Techno-economic Feasibility of Large scale Production of Bio-based Polymers in Europe*. European Commission.
- Cristina T. Matos, Raquel Fortunado, Svetlozar Velizarov, Maria A.Mreis, João G.Crespo. Removal of mono-valent oxyanions from water in an ion exchange membrane bioreactor: Influence of membrane permselectivity.
- Daigger G. T., Grady, C.P.L., 1982. The dynamics of microbial growth on soluble substrates. Water Res. 16, 365-382.
- Dias JML, Lemos PC, Serafim LS, Oliveira C, Eiroa M, Albuquerque MGE, Ramos AM, Oliveira R, Reis MAM (2006) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. Macromol Biosci 6: 885-906.
- Feng LD, Watanabe T, Wang Y, Kichise T, Fukuchi T, Chen GQ, Doi Y and Inoue Y (2002) Studies on co-monomer compositional distribution of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and thermal characteristics of their fractions. Biomacromolecules 3(5): 1071-1077
- Grothe E, Moo-Young M, Chisti Y (1999) Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme Microb Technol 25: 132– 41.

-
- G. Wisniewska, T. Winnicki, Acidic wastewater treatment by Donnan dialysis involving tubular anion-exchange membranes, *Desalination* 68 (1988) 121-130.
 - H. Tanabe, H. Okochi, M. Igawa, Separation of weak and bases by neutralization dialysis, *Ind. Eng. Chem., Research* 34 (1995) 2450-2454.
 - KESTING, RE. Synthetic polymeric membranes. New York: McGraw- Hill Book Company, 1971.p.181-226.
 - Kunioka, M and Doi, Y (1990) Thermal degradation of microbial copolyesters – poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* 23 (7): 1933-1936.
 - Lee, S.Y. (1996), Plastic bacteria - progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, p. 431-438.
 - Lee SY, Choi J (1998) Effect of fermentation performance on the economics of poly-(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym Degrad Stab* 59: 387-393
Lee SY, Choi J, Wong HH (1999) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *Int J Biol Macromol* 25: 31-36.
 - Madison LL, Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly-(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 21– 53.
 - Mitomo H, Takahashi T, Ito H and Saito T (1999) Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Burkholderia cepacia* D1. *Internal Journal of Biological Macromolecules* 24(4): 311-318.
 - MULDER, M., 1992, "Basic Principles of Membrane Tchnology", 1st ed., Boston, Dordrecht, Kluwer Academic Publisher.

-
- R.M. Wallace, Concentration and separation of ions by Donnan membrane equilibrium, Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev. 6 (1967) 423-431.
 - M. Igawa, K. Echizenya, T. Hayashita, M. Seno, Neutralization dialysis for deionization, Bull. Chem. Soc. Jpn. 60 (1987) 381-383.
 - Serafim, LS, Lemos, PC, Albuquerque MGE and Reis, MAM (2008a) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. Applied Microb and Biotechnol, 81 (4).